

**Plasmazytoide dendritische Zellen (PDC):
Suche nach einem Liganden des humanen PDC-spezifischen
Oberflächenrezeptors CD303 und funktionelle Charakterisierung
von murinen Sca-1⁺ und Sca-1⁻ PDC-Subpopulationen**

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades

Dr. rer. nat.

der Fakultät für
Biologie

an der

Universität Duisburg-Essen

vorgelegt von

Marina Niederquell
aus Nikolskij, Kasachstan

Oktober 2012

Die der vorliegenden Arbeit zugrunde liegenden Experimente wurden in der Forschungs- und Entwicklungsabteilung der Miltenyi Biotec GmbH in Bergisch Gladbach durchgeführt.

1. Gutachter: Prof. Dr. Ralf Küppers

2. Gutachter: Prof. Dr. Carsten Kirschning

Vorsitzende des Prüfungsausschusses: PD Dr. Wiebke Hansen

Tag der mündlichen Prüfung: 21.12.2012

Meiner Familie gewidmet

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis

Tabellenverzeichnis

1. Einleitung	13
1.1 Das Immunsystem	13
1.2 Dendritische Zellen	15
1.3 Plasmazytoide dendritische Zellen	16
1.4 C-Typ-Lektine	19
1.5 CD303	22
1.6 Zielsetzung dieser Arbeit	23
2. Material und Methoden	24
2.1. Materialien	24
2.1.1 Geräte, Zubehör und Verbrauchsmaterialien	24
2.1.2 Chemikalien und weitere Reagenzien	26
2.1.3 Lösungen	28
2.1.4 Antikörper und Antikörperkonjugate	30
2.1.5 Rekombinante Proteine	31
2.1.6 Zucker	32
2.1.7 Pathogene Strukturen	32
2.1.7.1 Pilze	32
2.1.7.2 HIV	32
2.1.8 Zellkulturmedien	33
2.2 Versuchstiere und Behandlungen	33
2.2.1 Isolation von murinen Zellen aus Milz, Lymphknoten und Knochenmark	34
2.3 Zellbiologische Methoden	34
2.3.1 Zellen und Zellkultur	34
2.3.2 Aufarbeitung von mononukleären Zellen des peripheren Blutes (PBMCs) aus Buffy Coats	36
2.3.3 <i>In vitro</i> Generierung von murinen PDCs	36
2.3.4 Kokulturansätze mit der NFAT-GFP A95-KK-Reporterzelllinie	36
2.4 Molekularbiologische Methoden	37
2.4.1 Generierung der rCD303 und rHA/Fc-Konstrukte	37
2.4.1.1 Aminosäuresequenz von rCD303 und rHA/Fc	37
2.4.2 Gentransfermethoden	38
2.4.2.1 Lipofektion	38
2.4.2.2 Elektroporation	38
2.4.3 Microarray-Analyse	39

2.4.4 Validierung der Genexpressionsanalyse mittels qRT-PCR	39
2.4.4.1 RNA-Isolation	39
2.4.4.2 cDNA-Synthese	40
2.4.4.3 Primerdesign	40
2.4.4.4 TaqMan-basierte qRT-PCR	41
2.5 Biochemische Methoden	41
2.5.1 Kopplung von rCD303 und rHA/Fc an CNBr-aktivierte Sepharose 4FF	41
2.5.2 Kopplung von AC144 an CNBr-aktivierte Sepharose 4FF	41
2.5.3 Proteinaufreinigung mittels Affinitätschromatographie	41
2.5.4 SDS-PAGE	42
2.5.5 PMF-Analyse	42
2.5.6 Western Blot-Analyse	43
2.5.7 <i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i> (ELISA)	43
2.5.7.1 rCD303 bzw. rHA/Fc-spezifischer ELISA	43
2.5.7.2 IFN- α und IL-12p70-spezifischer ELISA	44
2.5.8 Deglykosylierung von Proteinen	44
2.5.9 Immunpräzipitation (IP)	44
2.5.9.1 Membranpräparation	44
2.5.9.1.1 Ultrazentrifugation (UZ)	44
2.5.9.1.2 Isolation der Transmembranfraktion mit Hilfe des <i>ProteoExtract</i> Kits	45
2.5.9.1.3 Totale Zelllyse	45
2.5.9.2 Immunpräzipitation mittels MicroBeads	45
2.5.9.3 Immunpräzipitation mittels Protein A-Sepharose	45
2.5.9.4 Immunpräzipitation mittels direkt gekoppelter Sepharose	46
2.5.10 <i>Ligand-based Receptor Capturing</i> (LRC) und massenspektrometrische QTOF-Proteinanalyse	46
2.6 Magnetischen Zellseparation (MACS)	47
2.7 Durchflusszytometrie	47
2.7.1 Färbung mit Fluoreszenz-markierten Antikörpern	47
2.7.2 CD303L-Färbung mit rCD303	48
2.7.3 FACS-Sortierung	48
2.7.4 Messung von Th1/Th2/Th17-Zytokinen	48
3. Ergebnisse	49
3.1 Herstellung und Qualitätskontrolle des rCD303-Proteins und des rHA/Fc-Kontrollproteins	49
3.2 Charakterisierung von rCD303 und rHA/Fc	54
3.2.1 Proteininstabilität	54
3.2.2 Glykosylierung der rekombinanten Proteine	57
3.2.3 Ca-2 ⁺ -abhängige CD303L-Bindung	61
3.3 Definition von CD303L ⁺ und CD303L ⁻ Zelllinien	62
3.4 Immunpräzipitation	65
3.4.1 Direkt gekoppelte rCD303-MicroBeads	65

3.4.2 Protein A-Sepharose und direkt gekoppelte rCD303-Sepharose	68
3.5 <i>Ligand-based Receptor Capturing</i> (LRC)	73
3.5.1 Validierungsuntersuchungen: CD222 ein Ligand von CD303?	76
3.6 Generierung einer funktionellen NFAT-GFP-Reporterzelllinie	78
3.6.1 Induktion von GFP in der A95-KK-Reporterzelllinie nach spezifischer Stimulation	80
3.7 Identifikation einer CD303L ⁺ funktionellen Zelllinie	82
3.7.1 Verstärkung der Signalintensität durch den Einsatz einer sensitiveren Reporterzelllinie	85
3.7.2 Identifikation einer funktionellen CD303L ⁺ Zelllinie mit Hilfe der A95-KK. 2H11.2C7 NFAT-GFP-Reporterzelllinie	86
3.7.3 Kokultur von rCD222 und seinen Liganden mit NFAT-GFP-Reporterzellen	87
3.7.4 Kokultur des NFAT-GFP-Reporters mit kommensalen Pilzen zur Identifikation eines funktionellen CD303L	88
3.7.4.1 Zucker-basierte Induktion von GFP in der A95-KK-Reporterzelllinie	90
3.7.5 Kokultur der NFAT-GFP-Reporterzelllinie mit HIV-1	91
3.8 Sca-1-Expression hängt von der Organverteilung und der genetischen Beschaffenheit des Mausstammes ab	93
3.9 Sca-1 ⁺ PDCs repräsentieren ein frühes Entwicklungsstadium von PDCs	98
3.10 Sca-1 wird nach einer TLR-abhängigen Stimulation hochreguliert	102
3.11 Sca-1-PDCs zeigen funktionelle Unterschiede im endosomalen TLR9-Signalweg	104
3.12 Osteopontin ist stark hochreguliert in Sca-1 ⁺ PDCs	107
4. Diskussion	112
4.1 Der Ligand von CD303: Seine Eigenschaften und Funktionen	112
4.2 Sca-1 definiert unterschiedliche Subpopulationen von murinen PDCs, die eine Heterogenität im endosomalen, aber nicht im lysosomalen TLR9-Signalweg aufweisen	121
4.3 Ausblick	127
5. Zusammenfassung	129
6. Literaturverzeichnis	131
7. Anhang	147
Danksagung	164
Lebenslauf	167
Eidesstattliche Erklärung	168

Abkürzungsverzeichnis

APC	Antigenpräsentierende Zellen
APC	Allophycocyanin
AS	Aminosäure
BCR	B-Zell-Rezeptor
BDCA	<i>Blood Dendritic Cell Antigen</i>
BSA	Rinderserumalbumin
BST2	<i>Bone marrow stromal antigen 2</i>
CBA	<i>Cytometric Bead Arrays</i>
CD	<i>Cluster of Differentiation</i>
CD303L	CD303-Ligand
cDC	konventionelle (myeloide) Dendritische Zelle
CLR	C-Typ-Lektin Rezeptor
CNBr	Cyanbromid
CpG-ODN	Cytosin-Phosphat-Guanin Oligodesoxynukleotide
CRD	Kohlenhydrat-erkennende Domäne
CTL	Zytotoxische T-Lymphozyte
DC	Dendritische Zelle
DCIR	DC Immunorezeptor
DC-SIGN	<i>Dendritic Cell-specific Intercellular Adhesion Molecule 3</i> (ICAM-3)-grabbing Nonintegrin (CD209)
Dectin-1/-2	DC-assoziiertes C-Typ-Lektin 1 und 2
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
DMF	Dimethylformamid
DT	Diphtherietoxin
DTR	Diphtherietoxin-Rezeptor
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>
ER	Endoplasmatisches Retikulum
FACS	<i>Fluorescence Activated Cell Sorting</i>
Fc	<i>Crystallisable fragment</i> , konstante Region eines Antikörpers der schweren Kette
FCS	Fötales Rinderserum
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
Flt3-L	<i>FMS-related tyrosine kinase 3 ligand</i>
FSC	Vorwärtsstreulicht
GAPDH	Glyceraldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
GFP	Grün-fluoreszierendes Protein
HA	Hemagglutinin
HBSS	<i>Hanks' Balanced Salt Solution</i>
HRP	Merrettich-Peroxidase
i.p.	intraperitoneal
IFN	Interferon
IFN-I	Typ I Interferon
Ig	Immunglobulin

IL	Interleukin
IP	Immunpräzipitation
IRAK-1/4	<i>IL1 receptor-associated kinase-1/4</i>
IRF	<i>Interferon regulatory factor</i>
ITAM	<i>Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motif</i>
ITIM	<i>Immunoreceptor Tyrosine-based Inhibitory Motif</i>
kDa	Kilodalton
KM	Knochenmark
LN	Lymphknoten
LPS	Lipopolysaccharid
LRC	<i>Ligand-based Receptor Capturing</i>
MACS	<i>Magnetic Activated Cell Sorting</i>
MB	MicroBeads
MFI	mittlere Fluoreszenzintensität
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex
MMR	Makrophagen Mannose-Rezeptor
mPDCA-1	<i>mouse Plasmacytoid Dendritic Cell Antigen-1</i>
MS	Massenspektrometrie
MyD88	<i>Myeloid Differentiation factor 88</i>
NFAT	<i>Nuclear Factor of Activated T-cells</i>
NF- κ B	<i>Nuclear Factor-κB</i>
NK-Zellen	natürliche Killerzellen
Opn/Spp1	<i>Osteopontin/Secreted phosphoprotein 1</i>
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PAMP	<i>Pathogen-Associated Molecular Pattern</i>
PBMC	Mononukleäre Zellen aus dem peripheren Blut
PBS	Phosphat-gepufferte Saline
PDC	Plasmazytoide dendritische Zellen
PE	R-Phycoerythrin
PEB	PBS-EDTA-BSA
PerCP	Peridin-Chlorophyll-Protein
PI	Propidiumjodid
PM	Plasmamembran
PMA	Phorbol-12-myristat-13-acetat
PMF	Petid-Massen-Fingerprint
PRR	<i>Pattern Recognition Receptor</i>
PVDF	Polyvinylidenfluorid
QTOF	<i>Quadrupole Time-Of-Flight</i>
rCD303	rekombinantes CD303-Protein
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	<i>Real Time-Polymerase Kettenreaktion</i>
Sca-1	<i>Stem cell antigen-1</i>
SDS	Natrium-Dodecyl-Sulfat
Siglec-H	<i>Sialic acid binding Ig-like lectin H</i>
SLE	systemischer Lupus erythematoses

SSC	Seitwärtsstreulicht
TBS	Tris-gepufferte Saline
TCR	T-Zell-Rezeptor
Th	T-Helferzelle
TLR	Toll-ähnlicher Rezeptor
TM	Transmembrandomäne
U	Einheit
UZ	Ultrazentrifugation
v/v	<i>volume per volume</i>
w/v	<i>weight per volume</i>

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1. Schematische Darstellung des endosomalen und lysosomalen TLR9-Signalweges nach (Gilliet <i>et al.</i> , 2008)	17
Abbildung 2. Struktureller Aufbau verschiedener C-Typ-Lektine (Kingeter und Lin, 2012)	20
Abbildung 3. Schematische Darstellung der Dectin-1 und Dectin-2-Genfamilie (Graham und Brown, 2009)	21
Abbildung 4. Schematischer Aufbau der rCD303- und rHA/Fc-Fusionsdomänen	37
Abbildung 5. rCD303-Aufreinigung mit Hilfe der Affinitätschromatographie	50
Abbildung 6. rCD303-spezifischer ELISA	52
Abbildung 7. SDS-PAGE und Western Blot-Analyse von rCD303 und rHA/Fc	53
Abbildung 8. Subklonierung der rCD303-Produzenten führte zu zwei produktiven Klonen	54
Abbildung 9. rCD303 bleibt unter verschiedenen Temperaturbedingungen stabil	55
Abbildung 10. Stabilität und Funktionalität von rCD303 unter verschiedenen Temperaturbedingungen	57
Abbildung 11. N-Glykosylierung von rCD303 und rHA/Fc	58
Abbildung 12. Einfluss der Deglykosylierung von rCD303 auf die Interaktion zwischen rCD303 und CD303L	60
Abbildung 13. N- und O-Deglykosylierung und Desialysierung des rCD303-, des rHA/ Fc- und des Rinder Fetuin-Proteins	61
Abbildung 14. Ca^{2+} -abhängige Bindung von rCD303 an seinen Liganden auf SK-MEL-5-Zellen	62
Abbildung 15. Identifikation von CD303L^+ und CD303L^- Zellen	64
Abbildung 16. Immunpräzipitation mit direkt gekoppelten rCD303-MB	66
Abbildung 17. Cytoscape-Darstellung der identifizierten Proteine nach einer IP mit rCD303-MB	67
Abbildung 18. Immunpräzipitation mit Sepharose als Matrix	69
Abbildung 19. GAPDH- und CD303L-Nachweis auf der Zelloberfläche von SK-MEL-5- und Raji-Zellen	72
Abbildung 20. Inhibition der GAPDH- bzw. CD303L-Färbung	73
Abbildung 21. CD222 kann spezifisch mit rCD303 durch LRC isoliert werden	74
Abbildung 22. CD222 kann als CD303L vorgeschlagen werden	75
Abbildung 23. Expression von CD222 auf CD303L^+ und CD303L^- Zelllinien	76
Abbildung 24. Inhibition der rCD303-Bindung durch CD222	77
Abbildung 25. Verstärkung der rCD303-Bindung an CD303L durch M6P	78
Abbildung 26. Etablierung einer funktionellen A95-KK NFAT-GFP-Reporterzelllinie	79
Abbildung 27. Western Blot-Analyse zum Nachweis der Fc γ -Expression	80
Abbildung 28. Stimulation von A95-KK.2H11-Zellen zur Induktion der GFP-Expression	81
Abbildung 29. AC144-MACSiBeads induzieren GFP-Expression in A95-KK.2H11 NFAT-GFP-Reporterzellen	82

Abbildung 30. Kokultur von A95-KK NFAT-GFP-Reporterzellen mit den Zielzelllinien MOLT-4, MCF-7 und T47D	83
Abbildung 31. Kokulturansatz der NFAT-GFP-Reporterzellen mit Zielzellen, die zuvor mit rIFN- α inkubiert wurden	84
Abbildung 32. Subklonierung der A95-KK.2H11-Zelllinie	86
Abbildung 33. Kokultur der A95-KK.2H11.2C7-Reporterzelllinie zur Identifikation eines funktionellen CD303L	87
Abbildung 34. Kokultur der A95-KK.2H11.2C7-Zelllinie mit CD222 und seinen Liganden	88
Abbildung 35. Kokultur von A95-KK.2H11 mit <i>A. fumigatus</i> und <i>C. albicans</i>	89
Abbildung 36. Kokultur von A95-KK-Reporterzellen mit diversen Sacchariden	90
Abbildung 37. Kokultur des NFAT-GFP-Reporters mit HIV-1, welches in PBMC produziert wurde	91
Abbildung 38. Kokultur des NFAT-GFP-Reporters mit HIV-1, welches in der SuPT1-CCR5- Zelllinie produziert wurde	92
Abbildung 39. Charakterisierung von PDCs anhand von Oberflächenmarkern	94
Abbildung 40. Heterogene Expression von Sca-1 in PDCs aus verschiedenen lymphatischen Organen	95
Abbildung 41. CD9- und Sca-1-Expression korrelieren nicht miteinander	96
Abbildung 42. Ly49Q, CCR9 und Sca-1 definieren unterschiedliche PDC-Subpopulationen	98
Abbildung 43. Sca-1 ⁺ PDCs erscheinen früh während der PDC-Entwicklung	99
Abbildung 44. Sca-1 ⁺ PDCs bilden die Vorläuferpopulation	102
Abbildung 45. Sca-1-Expression kann durch eine TLR7/9-abhängige Stimulation und durch rIFN- α hochreguliert werden	104
Abbildung 46. Sca-1 ⁺ PDCs haben eine höhere Kapazität zur IFN- α -Produktion nach TLR9- spezifischer Stimulation	105
Abbildung 47. Produktion von proinflammatorischen Zytokinen in Sca-1 ⁺ und Sca-1 ⁺ PDCs nach Stimulation des lysosomalen TLR9-Signalweges	107
Abbildung 48. Validierung der differentiellen Spp1-Expression in Sca-1 ⁺ und Sca-1 ⁺ <i>ex vivo</i> PDCs	110
Abbildung 49. Funktionelle Annotation von hochregulierten Genen in Sca-1-PDCs gemäß MIGO	111

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1. PMF-Analyse der oberen Proteinbande (~ 38 kDa)	70
Tabelle 2. PMF-Analyse der unteren Proteinbande (~ 30 kDa)	70
Tabelle 3. Kandidaten, die mit direkt gekoppelter rCD303-Sepharose präzipitiert werden konnten	71
Tabelle 4. Hochregulierte Gene in Sca-1-PDCs	108

1. Einleitung

1.1 Das Immunsystem

Das Immunsystem ist das biologische Abwehrsystem höherer Lebewesen gegen alle Krankheitserreger wie Mikroorganismen (Viren, Bakterien und Parasiten) und Fremdstoffe, die in den Körper gelangen. Weiterhin kann das Immunsystem, das aus einem komplexen Netzwerk von Organen, Zellen und löslichen Faktoren besteht, krankhaft entartete körpereigene Zellen, die bei der Entstehung von Krebs eine entscheidende Rolle spielen, erkennen und eliminieren. In Säugetieren existieren zwei grundlegende Verteidigungsmechanismen, die sich aus der angeborenen und der erworbenen (adaptiven) Immunität zusammensetzen. Die angeborene Immunität bildet die erste unspezifische Verteidigungslinie gegen Pathogene, wohingegen die adaptive Immunität zeitlich verzögerte antigenspezifische Immunantworten auslöst und zur Ausbildung eines immunologischen Gedächtnisses führt (Lo *et al.*, 1999; Medzhitov, 2007).

Die erste Instanz der angeborenen Immunabwehr setzt sich aus verschiedenen Barrieren zusammen. Anatomische Barrieren, wie Haut, die eine geschlossene Oberfläche bildet, und Schleimhäute (Mukosa), verhindern das Eindringen von Pathogenen. Physikalische Barrieren (aktive Darmbewegungen, Husten, Fieber) und chemische Barrieren (Sekrete und Säuren in Haut, Magen und Darm) führen zum aktiven Ausschleusen bzw. zur Inaktivierung und Zerstörung der eingedrungenen Mikroben. Die zweite Stufe der natürlichen Abwehr wird aus dem Komplementsystem, das sich aus Plasmaproteinen zusammensetzt, und der Phagozytose gebildet (Tomlinson, 1993; Reis e Sousa, 2001; Medzhitov und Janeway, 2000a). Hervorgerufene Entzündungsreaktionen führen auf der einen Seite zur Aktivierung des Komplementsystems, wodurch Krankheitserreger opsoniert und durch Phagozyten aufgenommen und zerstört werden. Auf der anderen Seite werden auch andere Abwehrzellen durch die Sekretion bestimmter Mediatoren wie Zytokine [z.B. Interferone (IFN), Interleukine (IL), Tumornekrosefaktor (TNF)] und Chemokine, die von Mastzellen und anderen Zellen des Immunsystems produziert werden, zum Ort der Entzündung rekrutiert. Zu den Phagozyten gehören neutrophile Granulozyten, Monozyten, Makrophagen und dendritische Zellen (DCs). Falls Bakterien in Gewebezellen eindringen und dadurch der Phagozytose durch Fresszellen entgehen, so erkennen natürliche Killerzellen (NK-Zellen) diese infizierten Zellen (ebenso Tumorzellen) und töten sie durch die Freisetzung toxischer Proteine wie Perforine oder Granzyme, die zur Perforation der Zellmembran und schließlich zur Apoptose der Zellen führen (Grundy *et al.*, 2007; Veugelers *et al.*, 2006; Ljunggren und Karre, 1990; Smyth *et al.*, 2002; Medzhitov und Janeway, 2000a; Medzhitov und Janeway, 2000b). Charakteristische hochkonservierte Struktur motive zur Erkennung von Pathogenen bilden Pathogen-assoziierte

molekulare Muster (*Pathogen-associated molecular patterns*, PAMPs), die aus Zuckermolekülen, Komponenten der bakteriellen Zellwand (Lipopolysaccharid, LPS), Peptiden oder Nukleinsäuren von Bakterien und Viren bestehen und von spezifischen *Pattern-Recognition* Rezeptoren (PRRs) verschiedener Immunzellen gebunden werden (Medzhitov, 2001; Janeway und Medzhitov, 2002a). Wichtige Vertreter der PRRs sind die Toll-ähnlichen Rezeptoren (TLRs, *Toll-like receptors*) und die C-Typ-Lektin Rezeptoren (CLRs). TLRs können unter anderem über den Transkriptionsfaktor NF- κ B eine starke Aktivierung der Immunzellen nach mikrobieller Bindung auslösen, während CLRs an der Phagozytose von Pathogenen beteiligt sein können (Akira und Takeda, 2004; Galiana-Arnoux und Imler, 2006; Figdor *et al.*, 2002; Matzinger, 2002; Janeway, 1989).

Einen effektiveren Schutz mit einer hohen Spezifität gegen Krankheitserreger bietet die adaptive Immunantwort, die Antigen-vermittelt erst einige Tage nach der Infektion einsetzt. Die wichtigsten Zellen des adaptiven Immunsystems sind neben den antigenpräsentierenden Zellen (APCs), wie den DCs, die T- und B-Lymphozyten. Sie vermitteln die zelluläre Antwort über zytotoxische T-Zellen (CTLs) und/oder die humorale Antwort über B-Zellen, die zu Plasmazellen ausdifferenzieren (Medzhitov und Janeway, 1998).

B-Zellen können Antigene spezifisch und direkt über Immunglobulin-Moleküle, die den B-Zell-Rezeptor (BCR) bilden und an die Zelloberfläche gebunden sind, aufnehmen. Nach der Aufnahme prozessieren und präsentieren B-Zellen die Antigene über Haupthistokompatibilitätskomplex (MHC)-Klasse II-Moleküle, die von antigenspezifischen T-Helferzellen des Typs 2 (T_H2 -Zellen) erkannt werden. Ein sekundäres kostimulatorisches Signal wird von der T_H2 -Zelle über CD154 (CD40-Ligand, CD40L) an die B-Zelle, die den Marker CD40 exprimiert, vermittelt. Diese Rückkopplungsreaktion führt zu einer klonalen Proliferation und einer anschließenden Differenzierung der naiven B-Zellen zu Antikörper-produzierenden Plasmazellen oder langlebigen Gedächtnis-B-Zellen (Rajewsky, 1996).

T-Zellen erkennen unterschiedliche Antigene in Form von Peptiden, die durch APCs auf der Zelloberfläche präsentiert werden. Endosomal aufgenommene Antigene exogenen Ursprungs werden über MHC-Klasse-II-Moleküle $CD4^+$ T-Zellen präsentiert, die im Anschluss durch die Sekretion bestimmter Zytokine weitere Effektorzellen aktivieren. Peptide, die aus endogenen Proteinen (z. B. nach Virusproduktion) generiert werden, werden hingegen auf MHC-Klasse-I-Moleküle geladen und vom T-Zell-Rezeptor (TCR) der $CD8^+$ T-Zellen erkannt und gebunden (Janeway, 1989; Wang, 2001). Diese differenzieren nach der Aktivierung zu zytotoxischen T-Zellen (CTLs). Für eine effiziente Aktivierung der CTLs, die eine Lyse von Tumorzellen oder Virus-infizierten Zellen induzieren, wird ein zusätzliches Aktivierungssignal durch kostimulatorische Moleküle (z. B. CD40, CD80, CD86), welche auf aktivierten

DCs hochreguliert werden, zur vollständigen Ausbildung der immunologischen Synapse benötigt (Cella *et al.*, 1996; Barry und Bleackley, 2002). Ohne das kostimulatorische Signal endet die Immunantwort naiver T-Zellen in Apoptose oder Anergie (fehlende Reaktion auf ein Antigen durch Abschalten der Immunantwort) (Kuwana, 2002). Durch die V(D)J-Rekombination der V-, D- und J-Gensegmente für den BCR und TCR wird eine hohe Diversität mit einer einzigartigen Antigenspezifität erreicht. Die Anzahl der Immunglobuline des BCR-Repertoires kann aufgrund von somatischer Hypermutation erhöht werden (Weigert *et al.*, 1980). Zusammen mit dem immunologischen Gedächtnis kann eine schnelle und effiziente Immunantwort im Falle einer wiederholten Infektion mit dem gleichen Pathogen erfolgen.

1.2 Dendritische Zellen

DCs wurden erstmals im Jahre 1973 von R. Steinman und Z. Cohn identifiziert und als aktivierende Zellen naiver T-Zellen mit sternförmigen Zytoplasmaausläufern (Dendriten) beschrieben (Steinman und Cohn, 1973). Es existieren unterschiedliche Subpopulationen humaner und muriner DCs, die sich im Knochenmark aus CD34⁺ hämatopoetischen Stammzellen entwickeln. Sie wandern im unreifen Stadium in die Peripherie aus, wo sie mit dem Antigen in Kontakt kommen und ausreifen (Shortman und Liu, 2002; Naik *et al.*, 2007; Shortman und Naik, 2007). Während des Reifungsprozesses durchlaufen aktivierte DCs einige funktionelle und phänotypische Veränderungen. Sie verlieren die Fähigkeit zur Phagozytose, regulieren Zelladhäsionsmoleküle und kostimulatorische Moleküle hoch und steigern ihre Antigenprozessierungs- und Präsentationsaktivität über MHC-Moleküle.

Die Heterogenität der DC-Subpopulationen basiert auf der Expression unterschiedlicher PRRs, die zur Induktion Pathogen-spezifischer Immunantworten führt (Steinman, 1991; Shortman und Liu, 2002). Weiterhin spielt die Abstammung, die Funktion und die anatomische Lokalisation der Zellen bei der Klassifizierung eine wichtige Rolle. Im humanen System werden DCs durch die Expression von MHC-Klasse-II-Molekülen und das Fehlen der Linien-spezifischen Oberflächenproteine wie CD3 (T-Zellen), CD19 (B-Zellen), CD14 (Monozyten), CD16 und CD56 (NK-Zellen) als *Lineage*-negativ charakterisiert. Grundsätzlich unterscheidet man neben Langerhans und interstitiellen DCs zwischen CD11c⁺ CD1c⁺ (BDCA-1⁺) CD123^{low} bzw. CD11c^{dim} CD1c⁻ CD123⁻ CD141⁺ (BDCA-3⁺) konventionellen (cDCs)/myeloiden DCs (MDCs1 bzw. MDCs2) und lymphoiden plasmazytoiden DCs (PDCs) (Thomas und Lipsky, 1996; Dzionek *et al.*, 2000; Grabbe *et al.*, 2000). PDCs werden durch den folgenden

Phänotyp charakterisiert: CD11c⁺ CD1c⁺ CD123⁺ (IL-3R α) CD303⁺ (BDCA-2) und CD304⁺ (BDCA-4) (Dzionek *et al.*, 2000; Liu, 2001; Banchereau *et al.*, 2000).

In der Maus werden durch die Expression der Marker CD8 und CD4 drei unterschiedliche mDC-Subpopulationen definiert: CD4⁺ DCs, CD8 α ⁺ DCs und CD4⁺ CD8 α ⁺ DCs (doppelt-negative DCs, DN DCs). Sie zeichnen sich alle durch eine hohe Expression der Marker CD11c und CD11b aus (Vremec und Shortman, 1997). Verglichen mit humanen PDCs weisen murine PDCs keine Expression der IL-3R α Kette des IL-3 Rezeptors auf. Sie exprimieren stattdessen große Mengen an CD45R (B220) und Ly-6C und intermediäre Level an CD11c, wohingegen keine Expression von CD11b zu detektieren ist (Nakano *et al.*, 2001; Asselin-Paturel *et al.*, 2001).

Im Jahre 2006 wurden zwei weitere Marker, die exklusiv auf murinen PDCs koexprimiert werden, identifiziert: BST2 (*Bone marrow stromal antigen 2*), auch bekannt als Tetherin, CD317 oder mPDCA-1, und Siglec-H (Blasius *et al.*, 2006b; Blasius *et al.*, 2006a). Für BST2 konnte allerdings gezeigt werden, dass es nach Stimulation mit Typ I Interferonen (IFN- α und IFN- β) und Interferon- γ auf vielen anderen Zelltypen wie B-Zellen und Endothelzellen hochreguliert werden kann (Blasius *et al.*, 2006b; Asselin-Paturel *et al.*, 2003).

1.3 Plasmazytoide dendritische Zellen

Plasmazytoide dendritische Zellen (PDCs) kommen sowohl in der Maus als auch im Menschen sehr niedrig frequentiert im peripheren Blut und lymphatischen Organen vor (0,2-0,8%) (Feldman *et al.*, 1995; Dzionek *et al.*, 2001; Facchetti *et al.*, 1988; Liu, 2005). Sie werden als professionelle Typ I Interferon (IFN-I)-produzierende Zellen definiert (Perussia *et al.*, 1985; Svensson *et al.*, 1996) und spielen eine entscheidende Rolle in der anti-viralen Immunantwort, bei der durch die Produktion von IFN-I die Replikation des Virus inhibiert bzw. eine Apoptose der Virus-infizierten Zelle induziert wird (Fitzgerald-Bocarsly, 1993; Kadowaki *et al.*, 2000; Krug *et al.*, 2001a; Krug *et al.*, 2001b; Pestka *et al.*, 2004). PDCs exprimieren die zellulären Sensoren TLR7 (CD287) und TLR9 (CD289), die einzelsträngige RNA und doppelsträngige DNA verschiedener Viren [z.B. Influenza, Zytomegalie-Virus (CMV), Herpes-simplex-Virus (HSV)] erkennen und IFN-vermittelte Immunantworten initiieren (Heil *et al.*, 2004; Diebold *et al.*, 2004; Krug *et al.*, 2004a; Lund *et al.*, 2003; Krug *et al.*, 2004b).

Die Bindung von Nukleinsäuren basiert auf unmethylierten CpG-reichen Motiven, wie sie auch im bakteriellen Genom vorkommen (Iwasaki und Medzhitov, 2004), und kann durch synthetische CpG-Oligonukleotide (ODN) nachgeahmt werden. Diese CpG-ODN-Moleküle

haben heutzutage eine wichtige Bedeutung in immunmodulatorischen Behandlungen gegen Asthma und Krebs (Kline, 2007; Murad und Clay, 2009). Weiterhin werden sie als Adjuvantien in Impfstoffen eingesetzt (Klinman, 2006).

Die Induktion von IFN-I in PDCs hängt mit der Retention der Nukleinsäuren im endosomalen Kompartiment zusammen und folgt der zeitlich-räumlichen Regulation (Honda *et al.*, 2005a). Eine Bindung von TLR9 im Endosom führt zur Aktivierung des Adaptorproteins MyD88 (*myeloid differentiation factor 88*) (Abb. 1). MyD88 rekrutiert Mitglieder der IRAK (*IL1 receptor-associated kinase*)-Familie IRAK-4 und IRAK-1. Nach sequentieller Phosphorylierung rekrutiert IRAK-1 die Kinase TRAF6 (TNF- α assoziierter Faktor 6) zum CTFP-Komplex (*cytoplasmic transductional-transcriptional processor*) und führt zur Aktivierung des Transkriptionsfaktors IRF-7 (*Interferon regulatory factor-7*), der als Dimer die Transkription der frühen IFN-Gene induziert (Muzio *et al.*, 1997; Marie *et al.*, 2000; Honda *et al.*, 2004; Honda *et al.*, 2005b). Eine essentielle Rolle in der Expression der IFN-Gene spielt das intrazelluläre Osteopontin (Opn-i), das mit MyD88 kolokalisiert und die Translokation von IRF-7 in den Nukleus beeinflusst (Shinohara *et al.*, 2006). Interessanterweise wird IRF-5 ebenfalls vom CTFP-Komplex des lysosomalen Kompartimentes aktiviert und führt in Abhängigkeit vom Transkriptionsfaktor NF- κ B zur Induktion proinflammatorischer Zytokine wie z.B. IL-6 und TNF- α in PDCs (Takaoka *et al.*, 2005) (Abb. 1).

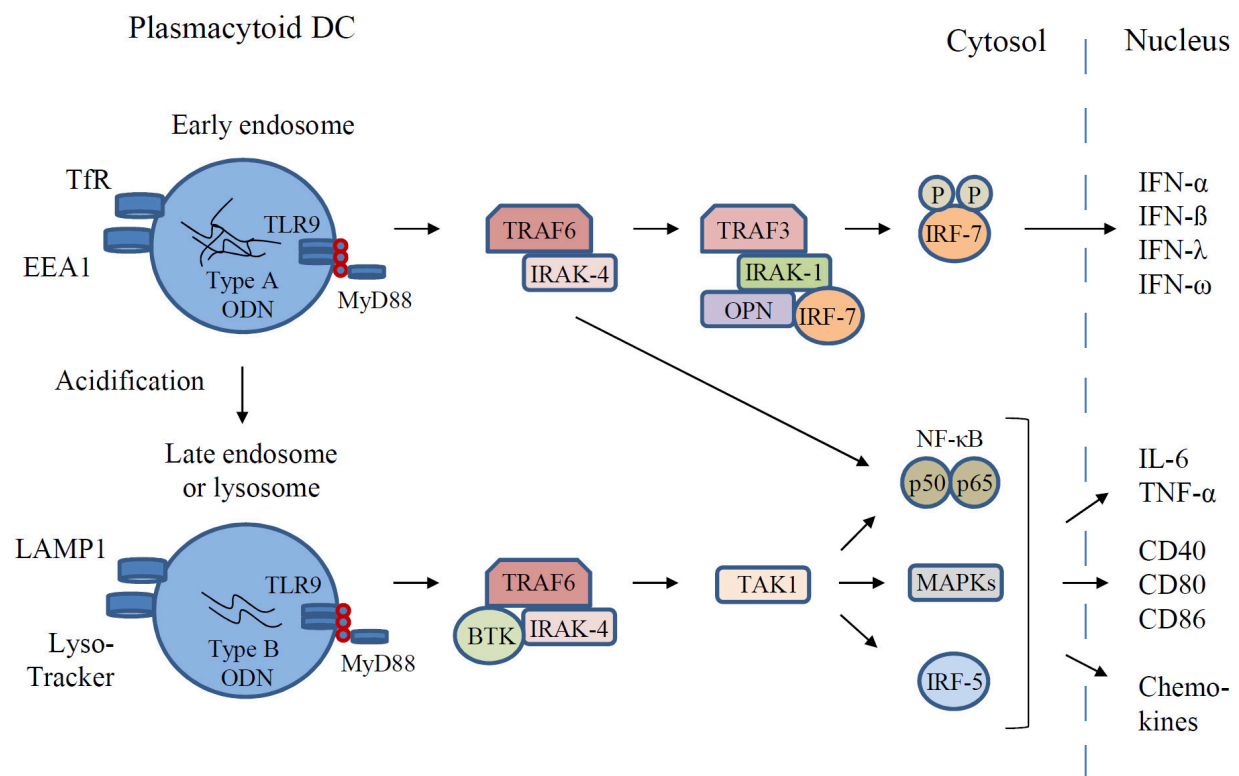


Abbildung 1. Schematische Darstellung des endosomalen und lysosomalen TLR9-Signalweges nach (Gilliet *et al.*, 2008)

Als Beispiele für TLR9-Liganden sind die Oligonukleotide CpG-A und CpG-B gezeigt. CpG-A bindet TLR9 im Endosom, welches durch die Marker TfR (Transferrin-Rezeptor) und EEA1 (*early endosomal antigen 1*) charakterisiert werden kann, während CpG-B das lysosomale TLR9 aktiviert. Spezifische Marker des Lysosoms sind LAMP1 (*lysosomal-associated membrane protein 1*) und LysoTracker. Weitere Erläuterungen siehe Text.

PDCs haben eine Schlüsselrolle in der Immunabwehr, indem sie die angeborene und die adaptive Immunität verbinden. Durch die Produktion von IFN-I wird das Überleben der T-Zellen und die Differenzierung der IFN- γ -produzierenden CTLs, die Aktivität von NK-Zellen und die Hochregulation von kostimulatorischen Molekülen auf cDCs erhöht bzw. induziert. Weiterhin bewirkt IFN- α phänotypische und funktionelle Reifung von Monozyten zu aktivierten antigenpräsentierenden dendritischen Zellen, die ebenso zur antiviralen Immunität beitragen (Krug *et al.*, 2004a; Biron *et al.*, 1999; Dalod *et al.*, 2003; Santini *et al.*, 2000; Honda *et al.*, 2003). IFN-I kann zusätzlich die Antikörper-vermittelte Antwort auf lösliche Antigene erhöhen und den Klassenwechsel der Immunglobuline genauso wie die Differenzierung von B-Zellen in Plasmazellen fördern (Le Bon *et al.*, 2001; Jego *et al.*, 2003). Im Gegensatz zu cDCs, ist IFN- α für das Überleben, die Aktivierung und die Migration von PDCs *in vivo* essentiell (Asselin-Paturel *et al.*, 2005).

PDCs können das adaptive Immunsystem aktivieren, indem sie T_H1 und T_H2 Immunantworten auslösen. Virus-stimulierte PDCs aktivieren naive T-Zellen zur Sekretion von IFN- γ und IL-10, wohingegen eine Stimulation humaner PDCs mit IL-3 und CD40L T-Zellen in Richtung T_H2-Differenzierung und zur Sekretion von IL-4, IL-5 und IL-10 treibt (Grouard *et al.*, 1997).

Eine aktuelle Theorie besagt, dass die Verknüpfung der angeborenen und der adaptiven Immunität sich auf der Ebene einzelner individueller PDCs durch die Produktion von IFN-I nach mikrobiellem Kontakt, der Einwanderung der Zellen in die sekundären lymphatischen Organe und der Stimulation der adaptiven T-Zellantwort ereignet (Zucchini *et al.*, 2007; Cella *et al.*, 1999; Yoneyama *et al.*, 2004). Stimuli, die eine hohe IFN-I-Produktion auslösen, führen zu einer schlechten Induktion der klassischen DC-Reifung und umgekehrt (Krug *et al.*, 2001; Kerkmann *et al.*, 2003). Das bedeutet, dass PDCs abhängig von der Art der Stimulation entweder hohe Mengen an IFN-I produzieren und unfähig sind T-Zellen zu stimulieren oder aber Antigene prozessieren und präsentieren, jedoch nur geringe Menge an IFN-I sezernieren (Jaehn *et al.*, 2008). Diese funktionelle Dichotomie kann durch das Vorhandensein mehrerer PDC-Subpopulationen mit unterschiedlichen Funktionen erklärt werden. So beschrieben unter

anderem Björck und Kollegen phänotypisch und funktionell unterschiedliche murine PDC-Subpopulationen basierend auf der CD9-Expression (Björck *et al.*, 2011). Die eine Subpopulation wurde im Knochenmark lokalisiert und produzierte IFN-I nach TLR9-Stimulation, während die andere Subpopulation hauptsächlich in der Peripherie zu finden war und tolerogene Eigenschaften aufwies (Björck *et al.*, 2011). Weiterhin wurden weitere Marker wie CCR9 und Ly49Q beschrieben, die eine heterogene Expression in murinen PDCs zeigten (Hadeiba *et al.*, 2008; Schlitzer *et al.*, 2011; Kamogawa-Schifter *et al.*, 2005; Omatsu *et al.*, 2005). Im Rahmen seiner Doktorarbeit identifizierte Fischer den Stammzellmarker Sca-1 (*stem cell antigen-1*) (Fischer, 2008), der funktionell unterschiedliche PDC-Subpopulationen definierte. Im humanen System wurden ebenfalls zwei Subpopulationen beschrieben, die unterschiedliche Kapazitäten in der Produktion von IFN-I und der Stimulation von T-Zellen zeigten (Schwab *et al.*, 2010). Molekulare Mechanismen, die diese heterogenen Eigenschaften zur IFN-I-Produktion und T-Zellstimulation durch PDCs erklären könnten, wurden bisher nicht gezeigt.

1.4 C-Typ-Lektine

Eine wichtige Funktion in der Erkennung von pathogenen Strukturen übernehmen die C-Typ-Lektine. Sie besitzen mindestens eine Kohlenhydrat-erkennende Domäne (*carbohydrate recognition domain*, CRD), die Kohlenhydrate in einer Calcium (Ca^{2+})-abhängigen Weise bindet (Drickamer, 1999). Die Familie der C-Typ-Lektine besteht aus klassischen und nicht-klassischen Mitgliedern, die in 17 Gruppen basierend auf der CRD-Organisation und der Phylogenie unterteilt werden (Drickamer, 1999; Zelensky und Gready, 2005). Klassische C-Typ-Lektine enthalten konservierte Ca^{2+} -Bindestellen und Motive, die eine Zuckerspezifität vermitteln, so wie das Mannose-bindende EPN (Glu-Pro-Asn)-Aminosäurentriplett oder das Galactose-bindende QPD (Gln-Pro-Asp)-Triplett (Drickamer, 1992). Nicht-klassische C-Typ-Lektine sind Ca^{2+} -unabhängig und binden in erster Linie keine Kohlenhydrate, weshalb die CRD auch als C-Typ-Lektin-ähnliche Domäne (*C-type lectin-like domain*, CTLD) bezeichnet wird. Zu dieser Gruppe gehören z.B. die Mitglieder des NKC (*Natural killer-gene complex*), die hauptsächlich auf T- und NK-Zellen, aber auch auf myeloiden Zellen exprimiert werden (Pyz *et al.*, 2006) und die zelluläre Aktivierung über die Erkennung von MHC-Klasse-I-Molekülen kontrollieren (Drickamer und Fadden, 2002; Yokoyama und Plougastel, 2003).

Neben einer Induktion der zellulären Aktivierung gibt es auch C-Typ-Lektine, die eine zelluläre Aktivierung inhibieren. Inhibitorische Rezeptoren enthalten ein Immunrezeptor Tyrosin-basiertes Inhibitionsmotiv (ITIM) in der zytoplasmatischen Domäne, während

Aktivierungsrezeptoren ein Immunrezeptor Tyrosin-basiertes Aktivierungsmotiv (ITAM) besitzen oder mit Signaladaptormolekülen wie DAP12, DAP10 oder der FcR γ -Kette assoziieren (Abb. 2). Allerdings gibt es auch Beispiele, wo ITAMs eine inhibierende und ITIMs eine aktivierende Wirkung ausüben (Barrow und Trowsdale, 2006; Pinheiro da Silva *et al.*, 2008). Fehlfunktionen in dieser Kontrolle werden oft mit starker Entzündung, Autoreaktivität und Krankheit verknüpft (Clynes *et al.*, 1999; Fujikado *et al.*, 2008; O'Keefe *et al.*, 1999).

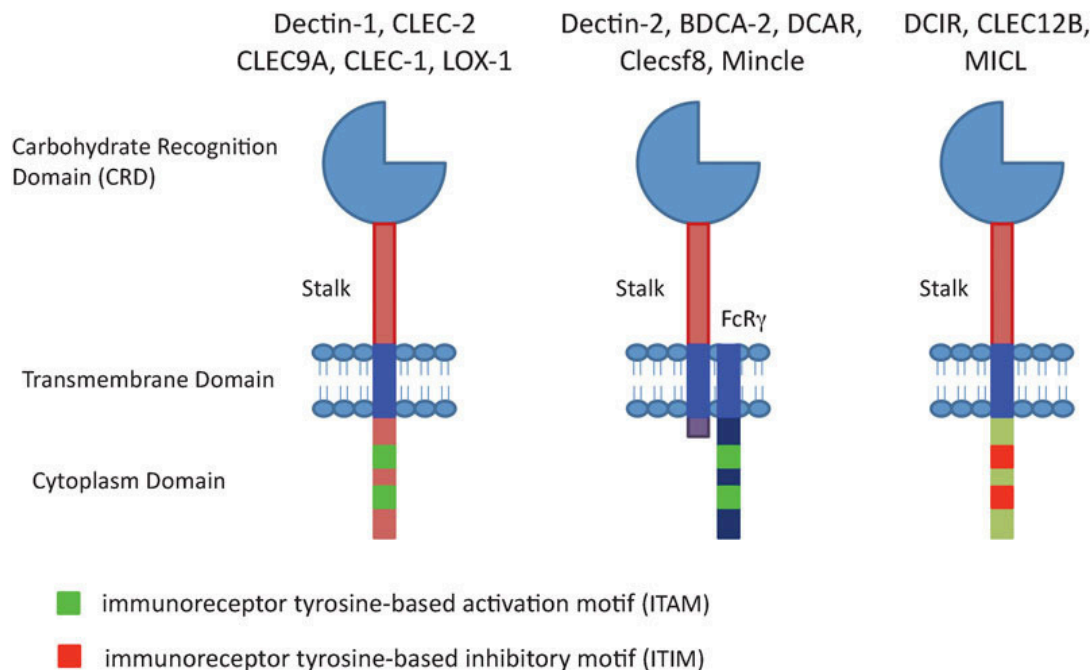


Abbildung 2. Struktureller Aufbau verschiedener C-Typ-Lektine (Kingeter und Lin, 2012)

Die abgebildeten C-Typ-Lektine enthalten alle eine extrazelluläre CRD-Domäne, eine transmembrane Domäne und eine zytoplasmatische Domäne, in der sie sich voneinander unterscheiden. Dectin-1, CLEC-2, CLEC9A, CLEC-1 und LOX-1 besitzen ein ITAM-Motiv in der zytoplasmatischen Domäne, wohingegen DCIR, CLEC12B und MICL eine ITIM-enhaltende Domäne aufweisen. Dectin-2, BDCA-2, DCAR, Clecsf8 und Mincle haben eine sehr kurze zytoplasmatische Domäne und assoziieren deshalb zur Signalweiterleitung mit der FcR γ -Kette, die ein ITAM-Motiv enthält.

Auf dem murinen Chromosom 6 und dem humanen Chromosom 12 wird in der NKC-Region die Gruppe der Dectin-1-Familie kodiert (Sobanov *et al.*, 2001). Zu dieser gehören Dectin-1, LOX-1 (*low-density lipoprotein receptor-1*), CLEC-1 (*C-type lectin-like receptor-1*), CLEC-2, CLEC12B, CLEC9A und MICL (*myeloid inhibitory C-type lectin-like receptor*) (Pyz *et al.*, 2006; Graham und Brown, 2009) (Abb. 3). Diese Rezeptoren binden unterschiedliche endo-

gene und exogene Liganden. Dectin-1 bindet z.B. an (1,3)-verknüpfte β -Glucane der Pilzzellwände (Brown und Gordon, 2001), während CLEC9A Liganden auf nekrotischen Zellen erkennt (Sancho *et al.*, 2009).

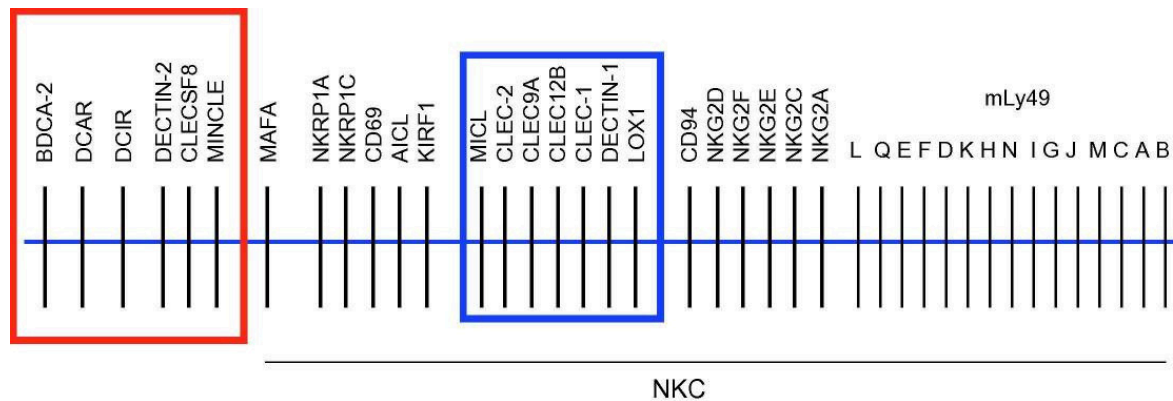


Abbildung 3. Schematische Darstellung der Dectin-1 und Dectin-2-Genfamilie (Graham und Brown, 2009)

Die Dectin-2-Genfamilie bildet ein Gen-Cluster, das durch das rote Viereck gekennzeichnet ist, in der telomeren Region des NKC (*Natural killer-gene complex*). Die Dectin-1 Genfamilie, die durch das blaue Viereck abgegrenzt ist, wird durch die Gene der NKC-Region auf dem murinen Chromosom 6 und dem humanen Chromosom 12 kodiert.

Eine weitere Genfamilie in der telomeren Region des NKC bildet die Dectin-2-Familie. Sie besteht aus multifunktionellen Rezeptoren, die eine wichtige Funktion in der Immunität und der Homöostase übernehmen, indem sie als PRRs fungieren und Pathogene wie Pilze und Viren erkennen oder an endogene Liganden binden. Mitglieder dieser Familie sind Dectin-2, DCIR, DCAR, BDCA-2 (CD303), Mincle und Clecsf8, die alle Transmembranproteine der Gruppe II mit einem extrazellulären C-Terminus und einem intrazellulären N-Terminus darstellen (Graham und Brown, 2009) (Abb. 3). DCIR ist dabei der einzige Rezeptor, der eine ITIM-Domäne besitzt (Kanazawa, 2007) (Abb. 2). Auch die Familie der Dectin-2 Rezeptoren spielt bei der Antigen-vermittelten Aufnahme von PAMPs und selbst-Antigenen eine wichtige Rolle. Abhängig von den C-Typ-Lektin-vermittelten Endozytosemechanismen werden internalisierte Antigene in frühen endosomalen bzw. späten endosomalen/lysosomalen Kompartimenten abgebaut und zur Regulation antigenspezifischer Immunantworten auf MHC-Klasse-I- und II-Moleküle geladen (Geijtenbeek *et al.*, 2004; Burgdorf *et al.*, 2007).

Viele der C-Typ-Lektine, zu denen auch der gut erforschte Typ II-Rezeptor DC-SIGN (*Dendritic Cell-Specific Intercellular adhesion molecule-3-Grabbing Non-integrin*, CD209) zählt, erfüllen nicht nur eine Aufgabe in der Zellaktivität des angeborenen und/oder adaptiven

Systems. Durch ein Zusammenspiel von C-Typ-Lektinen und TLRs, die auf APCs exprimiert werden, wird eine Feinregulierung der Immunaktivierung und der Toleranz erreicht. So führt eine gleichzeitige Aktivierung von DC-SIGN und TLR4 zu einer reduzierten DC-Reifung und einer verstärkten IL-10-Produktion (van Kooyk und Geijtenbeek, 2003; Geijtenbeek *et al.*, 2003). Eine zeitgleiche Bindung an Dectin-1 und TLR2/6 induziert eine starke Sekretion von TNF- α und IL-12, was zu einer T_H1-Antwort führt (Gantner *et al.*, 2003). Andere Rezeptoren wie z.B. das humane DCIR und CD303 regulieren die DC-vermittelte Immunität, indem sie die TLR-induzierte Zytokinausschüttung inhibieren (Meyer-Wentrup *et al.*, 2008; Meyer-Wentrup *et al.*, 2009; Dzionek *et al.*, 2001). Diesen Mechanismus können Pathogene ausnutzen, um der Immunantwort zu entfliehen (Cambi *et al.*, 2005).

1.5 CD303

CD303, auch bekannt als BDCA-2 (*Blood Dendritic Cell Antigen-2*), wird spezifisch von humanen PDCs exprimiert und dient als Marker für die Identifikation dieser Zellen (Dzionek *et al.*, 2000). Als Typ II C-Typ-Lektin besitzt CD303 ein EPN-Motiv in der extrazellulären CRD. Mannose-bindende CD303-Liganden (CD303L) konnten allerdings bisher nicht identifiziert werden (Fernandes *et al.*, 2000; Arce *et al.*, 2001). Zur Analyse des CD303-Signalweges wurde ein CD303-spezifischer monoklonaler Antikörper (AC144) eingesetzt, um eine Kreuzvernetzung des Rezeptors zu induzieren und die Bindung eines putativen Liganden an CD303 nachzuahmen (Dzionek *et al.*, 2001). Nach Bindung des Antikörpers assoziiert die intrazelluläre Domäne von CD303 mit der FcR γ -Kette und bildet den Immunrezeptorkomplex (Röck *et al.*, 2007; Cao *et al.*, 2007). Die Aktivierung von CD303 bewirkt eine Phosphorylierung von Tyrosinresten der ITAM-Domäne der FcR γ -Kette, was zur Aktivierung der Komponenten des BCR-Signalosoms führt. Die Phosphorylierung mehrerer intrazellulärer Proteine des BCR-Signalosoms (Syk, SLP65, PLC γ 2) induziert die Generierung von sekundären Botenstoffen wie IP3 (Inositol-1, 4, 5-triphosphat) und DAG (Diacylglycerol), die eine Mobilisierung von Ca²⁺ und eine Aktivierung der Proteinkinase C (PKC) auslösen. Als eine mögliche Konsequenz der PKC-Aktivierung resultiert die Ligation des CD303-Rezeptors in einer Inhibition der IFN-I-Produktion (Röck *et al.*, 2007; Dzionek *et al.*, 2001). Der CD303-Signalweg ist an eine Clathrin-vermittelte Endozytose (Internalisation) des CD303-Antikörperkomplexes gekoppelt. Dieser wird aufgrund eines Signalpeptids in das späte endosomale/lysosomale Kompartiment geleitet, wo die Antigenbeladung und Präsentation über MHC-II-Moleküle eingeleitet wird. Das Signalpeptid besteht aus einer sauren Triade (EEE) und ist in der aminoterminalen zytoplasmatischen Domäne von CD303

lokalisiert (Röck *et al.*, 2007; Mahnke *et al.*, 2000). Diese Tatsache lässt auf Funktionen als Pathogenrezeptor schließen. CD303 hat aber auch wichtige immunregulatorische Eigenschaften, da die IFN-I-Sekretion durch CpG-Motive aktivierter PDCs vollständig inhibiert werden kann (Dzionek *et al.*, 2001). Eine chronische Aktivierung von PDCs führt zur unkontrollierten Ausschüttung von IFN-I. Diese wird im Zusammenhang mit der Pathophysiologie von Autoimmunerkrankungen gebracht. So akkumulieren IFN-I-produzierende PDCs in den entzündeten Geweben von SLE (systemischer Lupus erythematoses) und Schuppenflechte (Psoriasis vulgaris)-Patienten. (Farkas *et al.*, 2001; Blomberg *et al.*, 2001; Nestle *et al.*, 2005). Eine Aufklärung der molekularen Regulationsmechanismen und die Identifikation von endogenen CD303L könnte die Entwicklung neuer therapeutischer Behandlungsstrategien gegen diese Krankheiten fördern.

1.6 Zielsetzung dieser Arbeit

Im Rahmen dieser Doktorarbeit soll der natürliche Ligand des humanen C-Typ-Lektin-Rezeptors CD303 isoliert und charakterisiert werden. Zu diesem Zweck soll aufbauend auf den Arbeiten von B. Kolbe (Kolbe, 2004; Kolbe, 2010) ein funktionelles rekombinantes CD303-Protein im eukaryotischen System hergestellt und analysiert werden. CD303L⁺ Zelllinien, die mittels rCD303 ermittelt werden sollen, dienen als Grundlage für biochemische Ansätze der Immunpräzipitation, die zur Identifikation des CD303L führen soll. Alternativ werden im Zuge einer Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Dr. B. Wollscheid der ETH Zürich kovalente Kreuzvernetzungsexperimente des rCD303-Proteins mit Glykoproteinen auf der Zelloberfläche CD303L⁺ Zellen durchgeführt. Die Funktionalität des CD303L soll zuletzt in einem zellbasierten Ansatz mit Hilfe der NFAT-GFP-Reporterzelllinie geprüft werden, um Erkenntnisse über die Regulation von Autoimmunerkrankungen zu gewinnen.

Das zweite Projekt dieser Arbeit wurde durch Vorarbeiten von Dr. J. Fischer (Fischer, 2008) und S. Kurig (unveröffentlicht) initiiert. Bisherige Ergebnisse, die funktionell unterschiedliche murine PDC-Subpopulationen aufgrund der Sca-1-Expression definieren, sollen validiert werden, um Sca-1 als einen neuen Marker muriner PDC-Subpopulationen mit verschiedenen Funktionen zu bestätigen. Weiterhin können Microarray-Genexpressionsanalysen von Sca-1⁺ und Sca-1⁻ PDCs einen näheren Einblick in die molekularen Mechanismen der Heterogenität geben.

2. Material und Methoden

2.1. Materialien

2.1.1 Geräte, Zubehör und Verbrauchsmaterialien

ABI PRISM 7000 Sequence Detection System	Applied Biosystems, Foster City, Kalifornien, USA
Agilent RNA 6000 Pico Kit	Agilent Technologies, Böblingen
Amersham Hybond-P, Polyvinylidendifluorid (PVDF)-Membran	GE Healthcare, München
Amersham Hyperfilm ECL	GE Healthcare
Bad-/Umwälzthermostat, Julabo EC	Julabo Labortechnik, Seelbach
<i>BCA Protein Assay Kit</i>	Pierce, Rockford, Illinois, USA
2100 <i>Bioanalyzer</i>	Agilent Technologies
Blockthermostat BT100	Kleinfeld Labortechnik, Gehrden
CO ₂ -Inkubator Typ BB6620	Heraeus Instruments, Hanau
<i>CellQuest</i> Software	BD Biosciences, Heidelberg
ELISA-Platte <i>Microlon</i> (96-Well)	Greiner Bio-One, Frickenhausen
<i>Emax Microplate ELISA Reader</i>	Molecular Devices, Sunnyvale, Kalifornien, USA
FACSCalibur Durchflusszytometer	BD Biosciences
Falcon-Röhrchen, konisch (50 ml, 15 ml)	BD Biosciences
<i>Fastblot</i> B34	Biometra, Göttingen
Feinwaage Typ CP224S	Sartorius, Göttingen
Filtereinheit Millex-AP, AP20, 50 mm-Vorfilter, 2 µm	Millipore, Eschborn
Filtereinheit Millex-GV 0,22 µm, PVDF	Millipore
Filterpapier, 3 MM Whatman	Schleicher & Schuell, Dassel
Flaschenfilter Rapid Filtermax 500 ml, 0,22 µm, PES	MIDSCI, St. Louis, Missouri, USA
<i>Gene Pulser II</i>	Bio-Rad Laboratories, München
<i>Gene Pulser/MicroPulser Cuvettes, 0.4 cm gap</i>	Bio-Rad Laboratories
gentleMACS <i>C-Tubes</i>	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
gentleMACS <i>Dissociator</i>	Miltenyi Biotec
Hämatologie Analysator Sysmex KX-21	Sysmex Corporation, Kobe, Japan
Homogenisator, Dounce, 2 Glaspistill, 2 ml	Kleinfeld Labortechnik
Kryoröhrchen	Nalgene Nunc, Rochester, USA
Leucosep-Röhrchen	Greiner Bio-One, Frickenhausen
MACSMix <i>Tube Rotator</i>	Miltenyi Biotec
MACSQuant <i>Analyzer</i>	Miltenyi Biotec
MACSQuantify Software	Miltenyi Biotec

MACS-Säulen (µ, MS, LS)	Miltenyi Biotec
MACS-Separatoren (OctoMACS, QuadroMACS)	Miltenyi Biotec
<i>Micro lance</i> Kanüle, 25 G	BD Biosciences
Mikrokonzentratoren, Microcon YM-10	Millipore
Mikroskop Leica DM IL LED	Leica, Bensheim
Mikrotiterplatten [96- (Flach- und Rundboden), 48-, 24-Well]	BD Biosciences
NanoDrop 1000 <i>Spectrophotometer</i> und Software	Thermo Scientific, Dreieich
NAP-5 Gelfiltrationssäule	GE Healthcare
Netzgerät, Elektrophoresis Power Supply – EPS 601	GE Healthcare
Neubauer-Zählkammer	Faust, Meckenheim
40-100 µm Nylonsiebe	BD Biosciences
PD-10 Gelfiltrationssäule	GE Healthcare
pH-Meter 765 Calimatic	Knick, Berlin
pH-Indikatorstäbchen pH 0 - 14 Universalindikator	Merck, Darmstadt
Pipetten (2-50 mL)	Sarstedt, Numbrecht
Präseparationsfilter	Miltenyi Biotec
Präzisionswaage, Typ KB 500-2	Kern, Balingen-Frommern
<i>qPCR Core Kit for SYBR Green I</i>	Eurogentec, Köln
Reinstwasseranlage Milli-Q Synthesis A10	Millipore
SoftMax Pro Software, ELISA	Molecular Devices
SpeedVac, <i>Concentrator</i> 5301	Eppendorf
Sterile Werkbank Herasafe HS12	Heraeus Instruments
<i>SuperScript II Reverse Transcriptase Kit</i>	Invitrogen, Karlsruhe
Thermomixer comfort 5355R	Eppendorf, Hamburg
10-20%ige Tris-Glycin-Gradienten-Gele	Anamed, Groß-Bieberau
Ultraschallbad Sonorex Super RK 510 H	Bandelin, Berlin
Ultrazentrifuge Sorvall RC-28S	Thermo Scientific
Ultrospec 3300 pro, <i>UV/Visible Spectrophotometer</i>	GE Healthcare
Vortex-Genie 2	Scientific Industries, Bohemia, New York, USA
XCell SureLook Mini-Cell Elektrophoresekammer	Novex, San Diego, Kalifornien, USA
Zellkulturflaschen (25-175 cm ²)	BD Biosciences
Zentrifuge Biofuge Primo	Heraus Instruments
Zentrifuge Eppendorf 5415R	Eppendorf
Zentrifuge Multifuge 4 KR	Heraus Instruments

2.1.2 Chemikalien und weitere Reagenzien

Chemikalien wurden, wenn nicht anders angegeben, von Merck (Darmstadt) oder Sigma-Aldrich (Seelze) bezogen.

AB-Serum, human	CellGro, Mediatech, Inc., Manassas, Virginia, USA
Anti-Biotin MACSiBeads	Miltenyi Biotec
ATP (Adenosin-5 f-Tri-Phosphat, di-Natriumsalz)	Roche, Mannheim
Beriglobin	CSL Behring, Hattersheim
Bromphenolblau	Serva, Heidelberg
Blasticidin S Hydrochlorid	
<i>B Cell Isolation Kit II</i> , Human	Miltenyi Biotec
Calciumchlorid	
CD44-MicroBeads	Miltenyi Biotec
Coomassie-Lösung	Pierce
CpG-A ODN 2216	Metabion, Martinsried
CpG-B ODN 1668	Metabion
Cyanbromid-aktivierte Sepharose 4 <i>Fast Flow</i>	GE Healthcare
<i>Cytometric Bead Array (CBA)</i> , Mouse Th1/Th2/Th17	BD Biosciences
Dimethylformamid (DMF)	
Dinatriumhydrogenphosphat (Na_2HPO_4)	
Diphtherietoxin (DT)	
DMSO (Dimethylsulfoxid)	
<i>ECL Western Blotting Detection Kit</i>	GE Healthcare
EDTA (Ethylendinitrilotetraacetat)	
Entwicklungslösung, Roentogen liquid	TETENAL, Norderstedt
Erythrosin B (Dinatrium-2,4,5,7- tetraiodfluoresceinat)	
Essigsäure/Eisessig	
Ethanol	
Ethanolamin	
Ficoll-Paque	GE Healthcare
Fixierlösung, Roentogen Superfix	TETENAL
Fötales Kälberserum (FCS)	PAA Laboratories, Pasching, Österreich
FuGENE6 Transfektionsreagenz	Roche
Geneticin (G418)	

GlycoPro Enzymatic Deglycosylation Kit for N-Linked & Simple O-Linked Glycans

ProZyme, Hayward, Kalifornien, USA

HBSS (mit Calcium und Magnesium, ohne Phenolrot)	Lonza, Köln
HEPES	Lonza
IgGZERO	Genovis, Lund, Schweden
IGEPAL CA-630 (NP-40)	
IL-12p70 ELISA Kit	eBioscience, Frankfurt
Ionomycin	
Isopropanol	
L-Glutamin (L-Glu)	Gibco, Karlsruhe
Magnesiumchlorid	
β-Mercaptoethanol	
Methanol	
MicroBeads zur direkten Kopplung	Miltenyi Biotec
Milchpulver	Frema, Herbolzheim
<i>Monocyte Isolation Kit II, Human</i>	Miltenyi Biotec
N-Ethylmaleimid (NEM)	
Natriumacetat	
Natriumchlorid (NaCl)	
Natriumhydroxid (NaOH)	
Natriumpyruvat (NaPyruvat)	
<i>NK Cell Isolation Kit, Human</i>	Miltenyi Biotec
NucleoSpin RNA II Kit	Macherey-Nagel, Düren
<i>PageRuler Prestained Protein Ladder</i>	Fermentas, St. Leon-Rot
<i>PDC Isolation Kit II, Maus und Human</i>	Miltenyi Biotec
Penicillin/Streptomycin (P/S)	Gibco
PNGaseF	New England Biolabs, Ipswich, USA
PMA	
Proleukin S	Novartis, Nürnberg
Propidiumjodid	
<i>Protease Inhibitor Cocktail tablets, complete EDTA-free</i>	Roche
Protein A-Sepharose	GE Healthcare
<i>ProteoExtract Transmembrane Protein Extraction Kit</i>	Merck Millipore
RapiGest	Waters, Milford, USA
R-848	Enzo Life Sciences, Lörrach

<i>Red Blood Cell Lysis Buffer</i>	Miltenyi Biotec
Rinderserumalbum (BSA), 20x	Miltenyi Biotec
Salzsäure (HCl)	
SDS (Sodiumdodecylsulfat)	
SDS-Laufpuffer (10x)	Anamed
Sepharose CL-4B	
<i>SilverQuest Silver Staining Kit</i>	Invitrogen
SMCC	
<i>Spleen Dissociation Kit</i> , Maus	Miltenyi Biotec
<i>TMB ready to use ELISA substrate</i>	Serva
Tris	Roth, Karlsruhe
Triton X-100	
Tween 20	Serva
<i>Pan T Cell Isolation Kit II</i> , Human	Miltenyi Biotec
<i>VeriKine Mouse Interferon Alpha ELISA Kit</i>	PBL Interferon Source, Piscataway, New Jersey, USA
Zeocin	Invitrogen

2.1.3 Lösungen

Blockpuffer für ELISA

PBS, 0,5% (w/v) BSA, 0,1% (v/v) Tween 20 bzw. PBS, 1% (w/v) BSA

Blockpuffer für Western Blot-Analyse

TBS, 5% (w/v) Milchpulver, 0,1% (v/v) Tween 20

Citrate Borate Phosphate (CBP)-Puffer

50 mM Zitronensäure-Monohydrat, 50 mM Borsäure, 50 mM Na₂HPO₄, pH 2,5

Färbepuffer für Durchflusszytometrie (Calcium-haltig)

HBSS, 0,5% (w/v) BSA

Hypotonischer Lysepuffer

10 mM Tris-HCl, pH 7,5, 0,5 mM MgCl₂

Kopplungspuffer für CNBr-aktivierte

0,1 M NaHCO₃, 0,5 M NaCl, pH 8,3

Lagerungspuffer für die mit AC144-Sepharose gepackte Säule

50 mM Tris-HCl, pH 8,0, 50 mM NaCl, 0,05% (v/v) NaN₃ [aus 10% (w/v) NaN₃]

Lagerungspuffer für die mit Protein A gepackte Säule

30% (v/v) Ethanol

Low salt-Puffer

20 mM Tris-HCl, pH 7,5

Nativer Lysepuffer

150 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl, pH 8,0, 0,1% Triton X-100, 1 mM MgCl₂, 1 mM CaCl₂

PBS (Phosphat-gepufferte Saline)

137 mM Natriumchlorid, 8,1 mM Dinatriumhydrogenphosphat, 2,6 mM Kaliumchlorid
1,4 mM Kaliumdihydrogenphosphat, pH 7,2

PBS/EDTA

PBS, 2 mM EDTA

PBS/EDTA/BSA (PEB)

PBS/EDTA, 0,5% (w/v) BSA

Für durchflusszytometrische Färbungen und magnetische Separationen wurde alternativ der CliniMACS PBS/EDTA-Puffer (Miltenyi Biotec) mit 0,5% (v/v) BSA (Miltenyi Biotec) supplementiert.

Protein-Lagerungspuffer

1xPBS, 0,05% (v/v) NaN₃ [aus 10% (w/v) NaN₃], pH 7,0

Proteintransferpuffer

48 mM Tris, 39 mM Glycin, 1,3 mM SDS, 10 % Methanol

Salz-haltiger CBP-Puffer

50 mM Zitronensäure-Monohydrat, 50 mM Borsäure, 4 M NaCl, 50 mM Na₂HPO₄, pH 9,0

SDS-Probenpuffer (5x), Ansatz pro ml

250 µl 1M Tris-HCl pH 6,8, 0,1 g SDS, 400 µl Glycerin, 50 µl 0,5 % (w/v) Bromphenolblau, mit dH₂O auf 1 ml auffüllen, 35 µl β-Mercaptoethanol für reduzierende Bedingungen

Tris-Buffered Saline (TBS)

150 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl, pH 7,6

TBS-Tween (TBST)

TBS, 0,1% (v/v) Tween 20

Totaler Zelllysepuffer

100 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 1% IGEPAL CA-630, 1 Tablette von Protease Inhibitor Cocktail

Waschpuffer für ELISA

PBS, 0,1% (v/v) Tween 20

2.1.4 Antikörper und Antikörperkonjugate

Zur Analyse von murinen und humanen Oberflächenmarkern wurden folgende FITC, PE, APC, Vioblue oder PE-Cy7 Fluoreszenz-markierte Antikörper verwendet. Die Antikörper wurden, falls nicht anders vermerkt, von Miltenyi Biotec bezogen. Isotypkontrollen für Maus Antikörper wurden ebenfalls von Miltenyi Biotec und für Ratte Antikörper von Invitrogen bezogen.

Spezifität	Klon	Hersteller
Ratte anti-Maus CD9	KMC8	eBioscience
Maus anti-Maus CD9	MZ3	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg
Ratte anti-Maus CD11b	M1/70.15.11.5	
Hamster anti-Maus CD11c	N418	
Ratte anti-Maus CD40	FGK45.5	
Ratte anti-Maus CD45R (B220)	RA3-6B2	
Hamster anti-Maus CD80	16-10A1	BD Biosciences
Ratte anti-Maus CD86	GL1	BD Biosciences
Maus anti-Maus CD199 (CCR9)	CW-1.2	eBioscience
Kaninchen anti-Ki67	polyklonal	Abcam, Cambridge, UK
Ratte anti-Maus Ly-6C	1G7.G10	
Ratte anti-Maus Ly49Q	2E6	MBL International, Woburn, Massachusetts, USA
Ratte anti-Maus MHC-Klasse-II	M5/114.15.2	
Ratte anti-Maus mPDCA-1	JF-05-1C2.4.1	
Ratte anti-Maus Sca-1	D7	
Ratte anti-Maus Siglec-H	551.3D3	

Maus anti-Human CD3	BW264/56	
Maus anti-Human CD20	LT20	
Maus anti-Human CD14	TÜK4	
Maus anti-Human CD222	MEM-238	AbD Serotec, Kidlington, UK
Maus anti-Human CD303	AC144	
Kaninchen anti-Human GAPDH	polyklonal	Cell Signaling, Beverly, Massachusetts, USA
Maus anti-Biotin	Bio3-18E7.2	
Maus anti-Cytokeratin 3 (CK3)	CK3-6H5	
Maus anti-HA	GG8-IF3.3	
Ziege anti-Kaninchen IgG	polyklonal	R&D Systems, Wiesbaden
Ziege anti-Kaninchen IgG (H+L)	polyklonal	Invitrogen
FcR Blockreagenz, Human und Maus		

Für Inhibitionsexperimente wurden folgende Antikörper eingesetzt:

Spezifität	Klon	Hersteller
Ziege anti-Human CD222	polyklonal	R&D Systems
Ratte anti-Maus IFN- α	F18	HyCult Biotechnologies, Uden, Niederlande
Ratte anti-Maus IFN- α	RMMA-1	PBL Interferon Source
Ratte anti-Maus IFN- α/β Rezeptor 1	polyklonal	R&D Systems, Wiesbaden

Für ELISA und Western Blot-Experimente wurden folgende Antikörper und Konjugate verwendet:

Spezifität	Klon	Hersteller
Kaninchen anti-Human Fc ϵ RI, γ -Untereinheit	polyklonal	
	Upstate – Cell signaling solutions, New York, USA	
Maus anti-Human IgG (Fc)-UNLB	JDC-10	Beckman Coulter, Fullerton, USA
Ziege anti-Human IgG (H+L)-Biotin	polyklonal	Thermo Scientific
Ziege anti-Kaninchen IgG (H+L)-HRP	polyklonal	
	Rockland Immunochemicals Inc. Gilbertsville, Pennsylvania, USA	
Streptavidin-Peroxidase (POD)	polyklonal	Roche

2.1.5 Rekombinante Proteine

Wenn nicht anderes angegeben, wurden die rekombinanten Proteine von Miltenyi Biotec bezogen.

Human CD222, R&D Systems

Human CD303, (Kolbe, 2004; Kolbe, 2010) und Gegenstand dieser Arbeit

HA/Fc Protein, (Kolbe, 2010) und Gegenstand dieser Arbeit

Maus Flt3 Ligand (Flt3-L), interne Produktionsvorstufe

Human Granzym B, Merck Millipore

Human IFN- α , PBL Interferon Source

Maus IFN- α

Human IGF-II

Human TGF- β 1

2.1.6 Zucker

β -N-Acetyl-D-glucosamin (GlcNAc), Lectinity, Moskau, Russland

Chitobiose [(GlcNAc)₂], Lectinity

α -L-Fucose, Lectinity

α -D-Galactose, Lectinity

β -D-Galactose, Lectinity

α -D-Glucose, Lectinity

β -D-Glucose, Lectinity

Lewis X, Lectinity

Lewis Y, Lectinity

α -D-Mannose, Lectinity

β -D-Mannose, Lectinity

D-Mannose-6-Phosphat, Sigma

Sialyl-Lewis X, Lectinity

2.1.7 Pathogene Strukturen

2.1.7.1 Pilze

Aspergillus fumigatus Lysat, Miltenyi Biotec, interne Produktionsvorstufe

Candida albicans Lysat, GREER Laboratories, Lenoir, North Carolina, USA

2.1.7.2 HIV

Aldrithiol inaktiviertes HIV-1 BAL/SuPT1-CCR5 CL.30, Lot P4311, und negative Kontrolle:

SuPT1-CCR5 CL.30 Microvesikel, Lot P4257, Arbeitsgruppe von Dr. J. Lifson des Frederick

National Laboratory for Cancer Research, Maryland, USA

(AIDS and Cancer Virus Program, SAIC Frederick, Inc./National Cancer Institute, Frederick, supported with federal funds from the National Cancer Institute, National Institutes of Health, under contract HHSN261200800001E.)

Inaktiviertes HIV-1 BRU aus Zellkulturüberständen einer PHA/Ionomycin stimulierter PBMC-Kultur, Dr. I. Johnston, Miltenyi Biotec

2.1.8 Zellkulturmedien

RPMI 1640 (Roswell Park Memorial Institute), Miltenyi Biotec

supplementiert mit 10% (v/v) FCS, 1% (v/v) L-Glu, 1% (v/v) P/S

Im Falle der A95-KK-Zelllinien und Knochenmarkzellen der Maus wurden folgende Zusätze zum supplementierten Standardmedium ergänzt: 1% (v/v) HEPES, 1% (v/v) NaPyruvat, 0,1% (v/v) β -Mercaptoethanol. Das komplett supplementierte Medium wird im folgendem „RPMI, voll“ bezeichnet.

Humane periphere mononukleäre Zellen (PBMCs) und separierte Primärzellen wurden in RPMI 1640, welches 5% (v/v) AB-Serum, 1% (v/v) L-Glu, 1% (v/v) P/S beinhaltetete, kultiviert.

DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) mit stabilem Glutamin, Miltenyi Biotec

supplementiert mit 10% (v/v) FCS, 1% (v/v) P/S

CD DG44, Gibco

supplementiert mit 8 mM L-Glu

Endothelial Cell Growth Medium MV Kit, PromoCell, Heidelberg

Endothelial Cell Growth Medium MV2 Kit, PromoCell

Einfriermedium

90% (v/v) FCS, 10 % (v/v) DMSO

2.2 Versuchstiere und Behandlungen

Für die Experimente, die dieser Arbeit zugrunde liegen, wurden weibliche Wildtyp-Mäuse des Stammes BALB/c bzw. C57BL/6 im Alter von 6-12 Wochen verwendet (Charles River, Sulzfeld). Die Tiere wurden entsprechend den staatlichen Regeln unter Pathogen-freien Bedingungen in den tierexperimentellen Einrichtungen der Miltenyi Biotec in Bergisch

Gladbach gehalten. Zur Untersuchung der Repopulation von plasmazytoiden dendritischen Zellen (PDCs) wurden CD303-Diphtherietoxin-Rezeptor (DTR) transgene Mäuse (C57BL/6) eingesetzt. Die entsprechende Maus wurde in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. M. Colonna (Washington Universität, St. Louis, USA) hergestellt und zur Verfügung gestellt (Swiecki *et al.*, 2010). Die Tiere wurden in einem heterozygoten Zustand gehalten und im Alter von 30-40 Wochen verwendet. Zur Depletion von PDCs wurden 5 ng des Diphtherietoxins (DT) pro g Mausekörpergewicht einmalig intraperitoneal (i.p.) in die Maus an Tag 0 injiziert.

2.2.1 Isolation von murinen Zellen aus Milz, Lymphknoten und Knochenmark

Milzzellen wurden sowohl mechanisch als auch enzymatisch mit Hilfe des gentleMACS und unter der Anwendung des *Spleen Dissociation Kits, mouse* aus dem Gewebe nach Herstellerangaben dissoziiert. Hierzu wurde eine Milz in 2,4 ml 1x Dissoziationspuffer in einem gentleMACS *Tube C* aufgenommen und mit 50 µl *Solution 1* und 15 µl *Solution 2* versetzt. Dieses *Tube* wurde verschlossen in einen gentleMACS Dissoziator platziert, sodass die erste mechanische Aufarbeitung mit dem Programm *m_spleen_02* erfolgen konnte. Anschließend wurde das *Tube* 15 min bei 37°C mit leichter Rotation auf dem MACSMix inkubiert, bevor die zweite mechanische Dissoziation auf dem gentleMACS mit dem Programm *m_spleen_03* erfolgte. Die Zellsuspension wurde über ein Präseparationsfilter gegeben, der anschließend mit 2,5 ml 1x Dissoziationspuffer nachgespült wurde. Die Zellen wurden daraufhin mit 300xg für 10 min bei Raumtemperatur (RT) pelletiert und im PEB-Puffer resuspendiert.

Periphere und mesenteriale Lymphknoten wurden aus Mäusen isoliert und in kaltem PEB-Puffer gelagert. Diese wurden anschließend mechanisch über 40 µm Nylonsiebe mit Hilfe von Spritzenstempel zerkleinert und vereinzelt. Die Einzelzellsuspension wurde im PEB-Puffer gewaschen (300xg, 10 min, 4°C) und anschließend wieder im PEB-Puffer resuspendiert.

Knochenmarkszellen aus dem Ober- und Unterschenkel einer Maus wurden durch den Einsatz einer 25 G Microlance Kanüle mit PEB-Puffer durchspült und einem anschließenden Filtrationsschritt über ein Präseparationsfilter isoliert. Die Zellen wurden in PEB-Puffer gewaschen (300xg, 10 min, 4°C) und zur weiteren Analyse erneut in PEB-Puffer aufgenommen.

2.3 Zellbiologische Methoden

2.3.1 Zellen und Zellkultur

Die in dieser Arbeit verwendeten Zelllinien und Primärzellen wurden im Inkubator bei 37°C in einer humiden Atmosphäre bei 5% CO₂ (bei Verwendung des RPMI 1640 und *Endothelial*

Cell Growth Medium MV und MV2 Mediums) bzw. 9% CO₂ (beim Einsatz des DMEM und CD DG44 Mediums) kultiviert:

<u>Zelllinie</u>	<u>Zellart bzw. Zellherkunft</u>	<u>Medium, supplementiert</u>
A-375	humanes malignes Melanom	DMEM
A95-KK	murines T-Zellhybridom	RPMI 1640, voll
CaCL 74-36	humanes malignes Melanom	DMEM
CHO DG44	<i>Chinese Hamster Ovary</i>	CD DG44
HDMEC	<i>Human Dermal Microvascular Endothelial Cells</i>	Endothelial Cell Growth Medium MV2 Kit
HD-MyZ	Hodgkin Lymphom ¹	RPMI 1640
HEK-293	<i>Human Embryo Kidney</i>	DMEM
HeLa	Epithelzellen, humanes Zervixkarzinom	DMEM
HUVEC	<i>Human Umbilical Vein Endothelial Cells</i>	Endothelial Cell Growth Medium MV Kit
Jurkat	T-Lymphozyten, humane akute T-Zell-Leukämie	RPMI 1640
MCF7	Epithelzellen, humanes Brustadenokarzinom	RPMI 1640
MEL-HO	humanes malignes Melanom	RPMI 1640
MeWo	humanes malignes Melanom	DMEM
MOLT-4	humane akute lymphoblastische Leukämie	RPMI 1640
Raji	B-Lymphozyten, humanes Burkitt-Lymphom	RPMI 1640
RAW 264.7	murine Makrophagen, <i>Abelson murine leukemia virus-induced tumor</i>	DMEM
RBL-1	<i>Rat Basophilic Leukemia</i>	RPMI 1640
SK-MEL-5	humanes malignes Melanom	DMEM
SK-MEL-28	humanes malignes Melanom	DMEM
SK-MEL-30	humanes malignes Melanom	RPMI 1640
ST486	B-Lymphozyten, humanes Burkitt-Lymphom	RPMI 1640
T-47D	Epithelzellen, humanes Brustadenokarzinom	RPMI 1640
U-266	B-Lymphozyten, humanes Plasmazytom	RPMI 1640
U-937	humanes histiozytisches Lymphom	RPMI 1640

¹Die HD-MyZ-Zelllinie wurde ursprünglich als eine Hodgkin Lymphom-Zelllinie beschrieben (Bargou *et al.*, 1993). Dies wird heute allerdings stark angezweifelt, da die Zelllinie wahrscheinlich eines myeloiden Ursprungs ist².

²Küppers R., Re D (2007) Nature of Reed-Sternberg and L&H cells, and their molecular biology in Hodgkin lymphoma. In: Hoppe RT, Armitage JO, Diehl V, Mauch PM, Weiss LM (eds) Hodgkin lymphoma. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, 2nd ed., p. 73-86

Suspensionszellen wurden in der Regel auf einer Lebendzellzahl zwischen 2×10^5 und 2×10^6 Zellen pro ml gehalten. Für die adhärenenten Zellen wurde das Medium alle zwei bis fünf Tage gewechselt. Vor Erreichen der Konfluenz wurden die Kulturen passagiert.

2.3.2 Aufarbeitung von mononukleären Zellen des peripheren Blutes (PBMCs) aus Buffy Coats

Das Blut eines Buffy Coats, das vom Institut für Transfusionsmedizin (Uniklinikum, Dortmund) bezogen wurde, wurde auf zwei 50 ml Falcon Röhrchen verteilt und mit 445xg für 35 min bei Raumtemperatur (RT) ohne Bremse zentrifugiert. Die mit Leukozyten angereicherte Schicht wurde vorsichtig abgenommen und in einem Gesamtvolumen von 35 ml (aufgefüllt mit PBS/EDTA) auf einen Ficoll-Gradienten (15 ml) in Leucosep-Röhrchen geschichtet. Die anschließende Dichtegradientenzentrifugation (1000xg, 10 min, RT, ohne Bremse) führte zu einer Konzentration der Leukozyten oberhalb der porösen Trennscheibe. Die PBMCs wurden isoliert und mit einem 10-fachem PBS/EDTA Volumen gewaschen (300xg, 15 min, RT). Durch ein vorsichtiges Abkippen des Überstandes wurden die meisten Thrombozyten entfernt. Die PBMCs wurden anschließend nochmal mit PBS/EDTA gewaschen (200xg, 10 min, RT) und in einem Endvolumen von 10-20 ml PBS/EDTA resuspendiert. Die Zellzahlbestimmung erfolgte entweder am Hämatologie Analysator Sysmex KX-21 oder am Durchflusszytometer MACSQuant *Analyzer*. Die Gesamtanzahl an isolierten PBMCs variierte zwischen 5×10^8 und 1×10^9 Zellen pro Buffy Coat.

2.3.3 *In vitro* Generierung von murinen PDCs

Knochenmarkzellen wurden wie in Kapitel 2.2.1 beschrieben isoliert. Erythrozyten wurden mittels *Red Blood Cell Lysis Buffer* nach Herstellerprotokoll für 12 min bei RT lysiert. Knochenmarkzellen wurden 3 mal mit Medium (RPMI 1640, voll, vgl. Kapitel 2.1.8) gewaschen (300xg, 10 min, RT) und in einer finalen Konzentration von 2×10^6 Zellen/ml resuspendiert. Murines Flt3-L wurde in einer Konzentration von 200 ng/ml dazu gegeben. An Tag 4, wurde 50% (v/v) des Mediums durch frisches Medium, welches mit 50 ng/ml mFlt3-L supplementiert wurde, ersetzt. *In vitro* generierte PDCs wurden an Tag 8-10 geerntet.

2.3.4 Kokulturansätze mit der NFAT-GFP A95-KK-Reporterzelllinie

Im Zuge eines funktionellen Zelllinienscreen wurden unterschiedliche Zielzellen (Zelllinien und Primärzellen) und diverse Strukturen wie rekombinante Proteine, Zucker und Pathogene mit Reporterzellen (CD303 und FcR γ -Einzeltransfektanten sowie den Doppeltransfektanten A95-KK.2H11 und A95-KK.2H11.2C7) in einem bestimmten Verhältnis unter verschiedenen

Zellkulturbedingungen nach einem finalen Zentrifugationsschritt (200xg, RT, 2 min) kokultiviert. Eine detaillierte Versuchsbeschreibung der einzelnen Ansätze ist dem Ergebnisteil zu entnehmen (vgl. Kapitel 3.6 und 3.7). In jeden Ansatz wurden sowohl positive als auch negative Kontrollen mitgeführt, die ebenfalls dem Ergebnisteil zu entnehmen sind. Die Effizienz der Kokultur wurde anhand der GFP-Expression, die am Durchflusszytometer MACSQuant *Analyzer* gemessen wurde, bestimmt.

2.4 Molekularbiologische Methoden

2.4.1 Generierung der rCD303 und rHA/Fc-Konstrukte

Die Herstellungsprozesse der rCD303 und rHA/Fc-Genexpressionskonstrukte erfolgten durch B. Kolbe und sind detailliert in seiner Diplom- und Doktorarbeit beschrieben (Kolbe, 2004; Kolbe, 2010). Zur Übersicht des Aufbaus der rekombinanten Proteine, die in den Experimenten dieser Arbeit eingesetzt wurden, sind die einzelnen Fusionsdomänen schematisch in Abb. 4 dargestellt.

N-Terminus

C-Terminus

rCD303	OM	HA	hIgG1-Fc	CD303
rHA/Fc	OM	HA	hIgG1-Fc	

Abbildung 4. Schematischer Aufbau der rCD303- und rHA/Fc-Fusionsdomänen

OM = Oncostatin M, HA = Hemagglutinin (Influenza Virus A), hIgG1-Fc = konstante Region des humanen IgG1-Moleküls, CD303 = extrazelluläre Domäne des humanen CD303 C-Typ-Lektins

2.4.1.1 Aminosäuresequenz von rCD303 und rHA/Fc

rCD303 [426 Aminosäuren (AS), 48,7 kDa, pKi 8,29)], von N- zum C-Terminus

```

1 MAEPKSASYPYDVPDYAPKSKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKP
51 KDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN
101 STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCRVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQ
151 VYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPV
201 LDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
251 SKSTVPHNFMYSKTVKRLSKLREYQQYHPSLTCVMEGKDIEDWSCCPTPW
301 TSFQSSCYFISTGMQSWTKSQKNC SVMGADLVVINTREEQDFIIQNLKRN
351 SSYFLGLSDPGGRRHWQWVDQTPYNENVTFWHS GEPNNLDERCAIIFRS
401 SEEWGWNDIHCHVPQKSICKMKKIYI

```

HA-Tag: AS 9-17
hFc-Tag: AS 28-247
extrazelluläre Domäne von CD303: AS 255-426

rHA/Fc (254 AS, 28,5 kDa, pKi 8,24), von N- zum C-Terminus

```

1 MAEPKSASYPYDVPDYAPKSKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKP
51 KDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN
101 STYRVVSVLTVQLHQLDGLNGKEYKCRVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQ
151 VYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPV
201 LDSGDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
251 SKSS

```

HA-Tag: AS 9-17
hFc-Tag: AS 28-247

2.4.2 Gentransfermethoden

2.4.2.1 Lipofektion

Zur Transfektion des rCD303 bzw. rHA/Fc-kodierenden Plasmids (pEF6/Myc-His A Vektor) (Kolbe, 2010) in CHO DG44-Zellen wurde die Lipofektion mit Hilfe des FuGENE6 Transfektionsreagenzes nach Herstellerangaben durchgeführt. Bei diesem Verfahren wird die negativ geladene DNA mit einem kationischen Lipid umhüllt, wodurch eine Endozytose des DNA-Lipid-Komplexes über die negativ geladene Zellmembran ermöglicht wird. Standardmäßig wurden durchschnittlich 1×10^7 Zellen mit einem Gemisch aus 10 µg der Plasmid-DNA und 30 µl des FuGENE6 Transfektionsreagenzes transfiziert. Nach einer über Nacht Kultur wurden 5 µg/ml des Antibiotikums Blasticidin S HCl als Selektionsmittel eingesetzt, um eine stabile Integration der Fremd-DNA ins Wirtsgenom zu fördern.

2.4.2.2 Elektroporation

A95-KK NFAT-GFP-Reporterzellen wurden entweder mit einzelnen CD303- bzw. FcRγ-kodierenden Plasmiden oder mit einer Kombination aus beiden Plasmiden zur Herstellung von Einzel- und Doppeltransfektanten mittels Elektroporation transfiziert. Dabei wurden standardmäßig 1×10^7 A95-KK-Zellen in 250 µl Medium (RPMI 1640, voll) resuspendiert und mit 40 µg Plasmid-DNA, welche ebenfalls in 250 µl Medium (RPMI 1640, voll) verdünnt wurde, in einer 0,4 cm Elektroporationsküvette gemischt. Nach einer 10-minütigen Inkubation bei RT wurden die Zellen unter der Verwendung der folgenden Einstellungen transfiziert:

Spannung: 270 V, Kapazität: 975 µF

Pulse controller II: Widerstand 200 Ω,

Gene Pulser II: Kapazität (µF) 500 V max. High Cap.

Nach dem elektrischen Impuls, der zur Permeabilität der Zellmembran und dem Einschleusen der DNA ins Zellinnere führte, wurden die Zellen für 10 min bei 37°C inkubiert und anschließend in eine T175-Zellkulturflasche transferiert. Nach einer über Nacht Kultur wurden folgende Selektionsmittel zum Vollmedium (RPMI 1640, voll + 200 U/ml Proleukin S, 250 µg/ml G418) dazugegeben:

A95-KK.CD303 – 5 µg/ml Blasticidin S HCl (pEF6/Myc-His A Vektor) (Kolbe, 2010)

A95-KK.FcRγ – 700 µg/ml Zeocin (pSELECT-zeo-mcs Vektor) (Kolbe, 2010; Röck, 2007)

A95-KK.CD303 und FcRγ – 5 µg/ml Blasticidin S HCl und 700 µg/ml Zeocin

2.4.3 Microarray-Analyse

Die differentielle Genexpressionsanalyse von Sca-1⁺ und Sca-1⁻ PDCs wurde in der zentralen Einrichtung des *Genomic Service* der Miltenyi Biotec durchgeführt. Vorab wurden *in vitro* generierte PDCs magnetisch angereichert und anschließend entsprechend der charakteristischen Expression der Oberflächenmarker Sca-1 und mPDCA-1 in die Sca-1⁺ und Sca-1⁻ Subpopulation durchflusszytometrisch sortiert. Eine Gesamtanzahl von $1-2 \times 10^5$ Zellen wurde direkt in 350 µl des RA1 Lysepuffers (NucleoSpin RNA II Kit) lysiert. Anschließend wurden die Proben zur Prozessierung an die *Genomic Service*-Abteilung übergeben. Standardmäßig wurde die gesamte RNA isoliert und auf die Integrität überprüft (RIN > 6, Agilent RNA 6000 Pico Kit und 2100 Bioanalyzer). Anschließend wurde die RNA amplifiziert, Cy3 markiert und über Nacht auf Agilent *Whole Mouse Genome Oligo* Microarrays (8x60 K) (Agilent Technologies) hybridisiert. Die Signalintensität gebundener RNA wurde mit Hilfe eines Scanners ermittelt und die Rohdaten wurden zur weiteren Analyse an die Bioinformatik-Abteilung der Miltenyi Biotec weitergeleitet. Für die statistische Auswertung wurden die Proben in einem Quadruplikat angefertigt und mittels *Discriminatory Gene Analysis* (DGA) prozessiert. Die signifikant regulierten Gene wurden anschließend gemäß der funktionellen Genannotation nach der *Gene Ontology* (GO)-Datenbank, die durch die Bioinformatik-Abteilung der Miltenyi Biotec (MIGO) kuratiert wird, analysiert.

2.4.4 Validierung der Genexpressionsanalyse mittels qRT-PCR

2.4.4.1 RNA-Isolation

Zur Validierung der Genexpression von Spp1 wurden Sca-1⁺ PDCs aus den Lymphknoten und Sca-1⁻ PDCs aus dem Knochenmark von BALB/c-Mäusen mit Hilfe einer Kombination aus MACS und FACS-Sortierung isoliert. Als positive Kontrolle für die Spp1-Expression wurde die murine Zelllinie RAW 264.7 eingesetzt. Die Gesamt-RNA aus 6×10^5 Sca-1⁻ PDCs

(Knochenmark), aus $6,5 \times 10^4$ Sca-1⁺ PDCs (Lymphknoten) und aus 1×10^6 RAW 264.7-Zellen wurde mittels NucleoSpin RNA II Kits nach Herstellerangaben isoliert. Die Integrität der RNA wurde mit Hilfe des Agilent RNA 6000 Pico Kits am 2100 *Bioanalyzer* nach Herstellerangaben überprüft (RIN > 7).

2.4.4.2 cDNA-Synthese

Für die cDNA-Synthese wurden die Proben (vgl. Kapitel 2.4.4.1) in der SpeedVac für 8 min im Falle der RAW 264.7-Zelllinie und für 16 min im Falle der Sca-1-PDCs bei 45°C eingedampft. Anschließend wurden die Proben mit RNase freiem dH₂O auf ein Gesamtvolumen von 11 µl aufgefüllt, mit 1 µl des PIQOR *antisense* Primermixes (Miltenyi Biotec) vermischt und für 10 min bei 70°C im Thermomixer (Eppendorf) inkubiert. Anschließend wurde der Ansatz sofort auf Eis gekühlt und kurz zentrifugiert. Die reverse Transkription erfolgte durch den Gebrauch des *SuperScript* II Kits. Folgende Komponenten wurden zum Reaktionsansatz hinzugefügt und vermischt: 4 µl des 5x *First Strand Buffers*, 2 µl von 0,1 M DTT, 1 µl der 10 mM dNTPs, pH7 (PEQLAB Technologie, Erlangen). Der gesamte Ansatz wurde zuerst für 10 min bei RT und anschließend für 2 min bei 42°C im Wasserbad inkubiert. Zum Reaktionsansatz wurde 1 µl der reversen Transkriptase hinzugefügt und gut vermischt. Dieser wurde dann 50 min bei 42°C im Wasserbad und anschließend für 15 min bei 70°C im Thermomixer inkubiert. Nach diesem Hitzeschritt wurde der Ansatz auf Eis abgekühlt, kurz zentrifugiert und bei -20°C gelagert.

2.4.4.3 Primerdesign

Das Primerdesign zur Spp1-Detektion erfolgte durch D. Küsters und Dr. S. Tomiuk (Miltenyi Biotec). Folgende Primersequenzen wurden von Metabion synthetisiert:

1. Primerpaar:

Vorwärtsprimer	Sequenz: 5'-TGGACTCGGATGAATCTGACG-3'
Rückwärtsprimer	Sequenz: 5'-CGACTGTAGGGACGATTGGAG-3'

2. Primerpaar:

Vorwärtsprimer	Sequenz: 5'-CCTCTCACATGAAGAGCGGTG-3'
Rückwärtsprimer	Sequenz: 5'-TGCCCTTTCCGTTGTTGTC-3'

2.4.4.4 TaqMan-basierte qRT-PCR

Die Spp1-Genexpressionslevel wurden durch die SYBR *Green*-basierte *real-time* PCR nach Herstellerangaben (*qRT-PCR Core kit for SYBR Green I*) am ABI PRISM 7000 *Sequence Detection Systems* bestimmt und entsprechend der Genexpressionslevel des *housekeeping*-Gens GAPDH mit der $\Delta\Delta C_T$ -Methode normalisiert. Dabei wurden zuerst die C_T -Werte (*Cycle Threshold*, Zyklusschwellenwert) der GAPDH-Expression von den C_T -Werten der Spp1-Expression innerhalb der jeweiligen Sca-1⁺ bzw. Sca-1⁻ PDC-Population voneinander abgezogen (ΔC_T). Anschließend wurde der ΔC_T -Wert der einen Population von dem ΔC_T -Wert der anderen Population abgezogen ($\Delta\Delta C_T$) und zur Ermittlung der n-fachen differentiellen Spp1-Expression in die folgende Gleichung eingesetzt:

$$\text{n-fache Expression} = 2^{-\Delta\Delta C_T}$$

2.5 Biochemische Methoden

2.5.1 Kopplung von rCD303 und rHA/Fc an CNBr-aktivierte Sepharose 4FF

Zur Kopplung von rCD303 und rHA/Fc wurden 1 mg bzw. 0,6 mg des Proteins, welches über PD-10 Sephadex Säulen in Kopplungspuffer umgepuffert wurde, eingesetzt. Die Kopplung erfolgte nach Herstellerangaben. Zuletzt wurden die Proteine im Protein-Lagerungspuffer gewaschen und bei 4°C bis zum Einsatz in der Immunpräzipitation gelagert.

2.5.2 Kopplung von AC144 an CNBr-aktivierte Sepharose 4FF

Die Kopplung von AC144 an CNBr-aktivierte Sepharose 4FF erfolgte nach Herstellerangaben. Zu diesem Zweck wurden 20 mg des AC144 Antikörpers zuerst über zwei PD-10 Sephadex Säulen (10 mg pro Säule) in Kopplungspuffer umgepuffert. Am Ende der Kopplungsreaktion wurde die AC144-Sepharose mit dem Protein-Lagerungspuffer gewaschen und bei 4°C gelagert.

2.5.3 Proteinaufreinigung mittels Affinitätschromatographie

Zellkulturüberstände kultivierter rCD303 oder rHA/Fc CHO DG44 Transfektanten wurden mit 4 M NaCl vermengt, mittels des 1 M Tris-HCl Puffers, pH 9 auf einem pH-Wert von 7 eingestellt und mit einer Kombination aus 2 µm und 0,22 µm Filtereinheiten steril filtriert. Zur Aufreinigung des rCD303-Proteins wurde eine Kombination aus zwei Säulen verwendet, die mit Protein A und AC144-Sepharose gepackt wurden. Zur Isolation des rHA/Fc-Proteins wurde ein einziger Aufreinigungsschritt mit Protein-A gepackter Säule durchgeführt.

Standardmäßig wurde der Lagerungspuffer der Protein A-Säule verworfen, die danach mit einem 5-fachen Säulenvolumen des Salz-haltigen CBP-Puffers, pH 9 äquilibriert wurde.

Anschließend wurde der jeweilige Kulturüberstand auf die Säule gegeben. Der Affinität zufolge konnte rCD303 und rHA/Fc über den Fc-Tag an Protein A gebunden werden. Die Säule wurde nach dem Aufreinigungsschritt mit einem 5-fachen Säulenvolumen des Salzhaltigen CBP-Puffers, pH 9 gewaschen und anschließend aufgrund einer pH-Verschiebung mit dem 5-fachen Säulenvolumen des CBP-Puffers, pH 2,5 in ein 50 ml Falcon-Röhrchen eluiert. Zur Neutralisation des pH-Wertes wurden ca. 5 ml des 1 M Tris-HCl, pH 9 Puffers in die Röhrchen vorgelegt. Der pH-Wert der Eluatfraktion wurde mit einem pH-Indikator überprüft und gegebenenfalls nachgestellt. Anschließend wurde die Säule 2 mal mit Salzhaltigem CBP-Puffer, pH 9 äquilibriert, mit Lagerungspuffer beschichtet und bei 4°C gelagert. Im Falle von rCD303 wurde zur besseren Reinheit ein 2. Aufreinigungsschritt über AC144-Sephrose durchgeführt. Abweichend von dem Protokoll der Aufreinigung über Protein A-Sephrose wurde der jeweilige Lagerungspuffer zur Äquilibration und für die Waschschrte eingesetzt.

Die eluierten Proteine wurden in einem nächsten Schritt über Mikrokonzentratoren aufkonzentriert (3x 3000xg, 10 min, 4°C) und in den Protein-Lagerungspuffer umgepuffert. Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte mit dem *BCA Protein Assay Kit* nach Herstellerangaben, bei der analog zu BSA Beriglobin zur Erstellung der Eichreihe verwendet wurde. Eine kurzzeitige Lagerung des aufgereinigten Proteins fand bei 4°C statt. Zur langfristigen Lagerung wurde das Protein aliquotiert und bei -70°C gelagert.

2.5.4 SDS-PAGE

Zur Größenauftrennung von Proteingemischen wurde die Natrium-Dodecyl-Sulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) durchgeführt. Proben wurden hierfür im reduzierenden SDS-Probenpuffer nach Lämmli (Laemmli, 1970) aufgenommen und für 5 min bei 95°C denaturiert. Danach wurden die Proben kurz zentrifugiert, auf 10-20%ige Tris-Glycin-Gele geladen und bei 220 V, 30 mA und 5 W pro Gel für 1 h und 15 min größenfraktioniert. Ein Größenmarker wurde dabei zur Identifikation der Proteingrößen eingesetzt. Anschließend wurde das Gel entweder in einer kolloidalen Coomassie-Lösung gefärbt oder zur Western Blot-Analyse verwendet.

2.5.5 PMF-Analyse

Zur Identifikation von Proteinen wurden entsprechende Proteinbanden aus dem SDS-Gel ausgeschnitten und zur Peptid-Massen-Print (PMF)-Analyse zum Zentrum für Molekulare Medizin der Universität zu Köln (ZMMK) an die Zentrale Bioanalytik (ZBA) geschickt.

2.5.6 Western Blot-Analyse

Nach der SDS-PAGE wurden die im Tris-Glycin-Gel aufgetrennten Proteine auf eine PVDF-Membran in einem *Semi-dry*-Verfahren übertragen. Die PVDF-Membran wurde zuvor mit 10%igem (v/v) Methanol aktiviert und kurz im Transferpuffer äquilibriert. Der Lauf erfolgte für 1 h bei 100 mA, 15 V und 1,5 W pro Gel. Zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen wurde die Membran nach dem Blotten mit Milch-haltiger Blocklösung für 1 h bei RT inkubiert. Anschließend wurde die Membran für 5 min mit TBST gewaschen und mit dem Primärantikörper für 1 h bei RT inkubiert. Es folgte ein 3-facher Waschschrift mit TBST für jeweils 5 min und eine weitere Inkubation für 1 h bei RT mit dem Peroxidase-gekoppelten Sekundärantikörper (1:10000). Die Membran wurde anschließend wieder 3 mal mit TBST für jeweils 5 min gewaschen. Nach einem letzten Waschschrift mit dH₂O für 5 min folgte die ECL-Detektion nach Anleitung des ECL-Kits.

2.5.7 Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

2.5.7.1 rCD303 bzw. rHA/Fc-spezifischer ELISA

Zur Untersuchung der Bindungskapazität spezifischer Antikörper an die unterschiedlichen Fusionsdomänen der rekombinanten Proteine rCD303 und rHA/Fc wurde eine 96-Well Platte (Flachboden) mit 5 µg/ml des Beschichtungsantikörpers [Maus anti-Human CD303 (AC144) oder Maus anti-Human IgG (Fc)-UNLB oder Maus anti-HA] in 1xPBS (100 µl/Well) über Nacht bei 4°C inkubiert. Die Platte wurde anschließend 3 mal mit Waschpuffer (350 µl/Well) gewaschen. Zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen wurde die Platte mit 200 µl/Well des Blockpuffers befüllt und für 2 h bei RT inkubiert. Nach einem wiederholten Waschschrift (s.o.) wurden unterschiedliche Konzentrationen der rekombinanten Proteine (höchste Konzentration: 500 ng/ml, danach serielle 1:2 Verdünnungen) im Blockpuffer in einer Doppelbestimmung angesetzt und in 100 µl/Well für 1 h bei RT inkubiert. Danach wurde die Platte erneut gewaschen (s.o.). Die Detektion gebundener Proteine erfolgte entweder direkt über den HA-Tag mit einem Peroxidase-gekoppelten anti-HA-Detektionsantikörper (1:10000 in Blockpuffer verdünnt) oder über einen Zwischenschritt, bei dem die Bindung des Fc-Tags zuerst mittels Ziege anti-Human IgG (H+L)-Biotin (1:10000 in Blockpuffer verdünnt) und anschließend mit Streptavidin-POD (1:10000 in Blockpuffer verdünnt) nachgewiesen wurde (100 µl/Well, 1 h, RT). Nach einem letzten Waschschrift (s.o.) wurde das TMB-Substrat dazugegeben (100 µl/Well) und die enzymatische Reaktion nach max. 15 min mit 10%iger (v/v) Schwefelsäure abgestoppt (100 µl/Well). Die relative Konzentration der Proben wurde anhand der Adsorption bei OD₄₅₀ mittels der SoftMax Pro Software bestimmt.

Beim Testen von Kulturüberständen wurde eine aufgereinigte Proteincharge als Referenz zur Erstellung der Kalibriergeraden verwendet und die Kulturüberstände entweder pur oder in unterschiedlichen Verdünnungen eingesetzt.

2.5.7.2 IFN- α und IL-12p70-spezifischer ELISA

Die Bestimmung der murinen IFN- α und IL-12p70 Konzentration in Zellkulturüberständen nach Stimulation von Sca-1⁺ und Sca-1⁻ PDCs erfolgte nach Herstellerangaben der spezifischen ELISA Kits.

2.5.8 Deglykosylierung von Proteinen

rCD303 bzw. rHA/Fc wurden gemäß Herstelleranleitung mit PNGase F, IgGZERO oder dem *GlycoPro Enzymatic Deglycosylation Kit* zur Deglykosylierung von N- und O-verknüpften Zuckern deglykosyliert. Entsprechend der eingesetzten Proteinmenge mussten die Proteine vorher mittels Mikrokonzentratoren aufkonzentriert werden.

2.5.9 Immunpräzipitation (IP)

Zur Isolation des CD303-Liganden (CD303L) wurden Immunpräzipitationen mit unterschiedlichen Matrices, die entweder direkt oder indirekt mit rCD303 gekoppelt wurden, durchgeführt.

2.5.9.1 Membranpräparation

2.5.9.1.1 Ultrazentrifugation (UZ)

Die Zellmembran CD303L⁺ Zellen wurde mit Hilfe der UZ präpariert und für IP-Ansätze verwendet. Dazu wurden pro Ansatz 1×10^8 Zellen eingesetzt. Diese wurden bei 1000xg für 5 min bei 4°C geerntet und durch einen wiederholten Zentrifugationsschritt in 2 ml 1xPBS gewaschen. Das Zellpellet wurde in 1 ml des kalten hypotonischen Lysepuffers resuspendiert und mit dem Dounce Homogenisator lysiert (jeweils 20 Schübe mit Glaspistill A und B). Das Lysat wurde anschließend bei 2500xg für 15 min bei 4°C zentrifugiert und der Membranüberstand in ein neues Gefäß transferiert. Das Nukleopellet und nicht aufgeschlossene Zellen wurden durch einen wiederholten Homogenisierungsschritt aufgebrochen. Nach erneuter Zentrifugation wurden beide Membranüberstände vereint und bei 75000xg für 1,5 h bei 4°C in der UZ zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Membranpellet wurde in 1,5 ml des kalten nativen Lysepuffers mit Hilfe des Ultraschallbads für 15 min resuspendiert.

2.5.9.1.2 Isolation der Transmembranfraktion mit Hilfe des *ProteoExtract Kits*

Transmembranproteine von 1×10^8 Zellen wurden entsprechend Herstellerangaben mittels *ProteoExtract Transmembrane Protein Extraction Kits* isoliert und mit jeweils 60 μ l von 0,25 M MgCl_2 und 0,25 M CaCl_2 , was für die Bindung des CD303L essentiell ist, in einem Endvolumen von 1,5 ml versetzt.

2.5.9.1.3 Totale Zelllyse

Zur Herstellung kompletter Zelllysate wurden 1×10^8 Zellen in 1,5 ml des totalen Zelllysepuffers aufgenommen und für 30 min auf Eis inkubiert. Währenddessen wurde die Suspension alle 5 min zur totalen Lyse vollständig gemischt (Vortex). Anschließend wurden die Zellkerne und Zelltrümmer bei 13000xg für 5 min bei 4°C pelletiert und der Überstand mit jeweils 60 μ l von 0,25 M MgCl_2 und 0,25 M CaCl_2 in ein neues Gefäß für den Einsatz in der IP überführt.

2.5.9.2 Immunpräzipitation mittels MicroBeads

rCD303 wurde gemäß einer firmeninternen Kopplungsvorschrift kovalent an paramagnetische MicroBeads in einer Konzentration von 25 μ g/ml gekoppelt. Als negative Kontrolle wurden leere Beads deaktiviert. Membranproteine von 1×10^8 Zellen wurden pro Ansatz mittels der UZ isoliert. Jeweils 16 μ g des rCD303-MB Konjugates oder die gleiche Menge an deaktivierten MicroBeads wurde pro Ansatz mit der Membranfraktion über Nacht zur Präzipitation des CD303L bei 4°C in einem MACSMix inkubiert. Nach der IP wurden die Ansätze magnetisch über MS-Säulen aufgereinigt (vgl. Kapitel 2.6) und die Beads 5 mal mit 500 μ l des nativen Lysepuffers gewaschen. Anschließend wurden 60 μ l von 0,2%igen RapiGest bzw. 0,05%igen RapiGest in Kombination mit 5 mM EDTA auf die Säulen gegeben und für 5 min bei RT inkubiert. Interagierende Proteine wurden danach mit 100 μ l des 0,2%igen RapiGest bzw. 0,05%igen RapiGest in Kombination mit 5 mM EDTA eluiert. Um zu überprüfen wie viele Proteine an der Säule haften blieben, wurde eine sekundäre Elution mit heißem reduzierendem 1xSDS-Probenpuffer durchgeführt. Die Proben wurden anhand von SDS-PAGE und Silberfärbung analysiert und die Proteine mit Hilfe der QTOF-Technologie von A. Frei identifiziert (vgl. Kapitel 2.5.10).

2.5.9.3 Immunpräzipitation mittels Protein A-Sepharose

Die IP mit Protein A-Sepharose wurde mit und ohne *Preclear* durchgeführt. Beim *Preclear* wurden 20 μ g des rHA/Fc-Proteins mit der Hälfte der jeweiligen Membranfraktion (UZ, Extraktionskit und totale Zelllyse) für 1 h im MACSMix rotierend inkubiert. Protein A-

Sepharose wurde währenddessen in entsprechenden Lysepuffern der jeweiligen Präparationsmethoden 5 mal bei 13000xg für 5 min bei 4°C gewaschen. Zuletzt wurde Protein A-Sepharose in 150 µl des jeweiligen Lysepuffers resuspendiert und mit der rHA/Fc-Membranfraktion über Nacht bei 4°C im MACSMix inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Protein A-Sepharose mit unspezifisch gebundenen Proteinen durch einen Zentrifugationsschritt (13000xg, 5 min, 4°C) entfernt und der Überstand in zwei Ansätze aufgeteilt. Zum einen Ansatz wurden 10 µg des rCD303-Proteins und zum anderen Ansatz 10 µg des rHA/Fc-Proteins dazugegeben und für 2 h bei 4°C im MACSMix inkubiert. Parallel dazu wurde die übrige Membranfraktion ohne *Preclear* auf die gleiche Weise mit den rekombinanten Proteinen inkubiert. Protein A-Sepharose wurde für die IP vorbereitet, indem sie 5 mal mit dem jeweiligen Lysepuffer äquilibriert wurde (13000xg, 5 min, 4°C). Danach wurden 60 µl der Protein A-Sepharose pro ml Lysat für 1,5 h und anschließend 30 µl der Protein A-Sepharose pro ml Lysat für 0,5 h bei 4°C im MACSMix mit dem Membranproteingemisch zur Präzipitation des CD303L inkubiert. Anschließend wurde die Protein A-Sepharose pelletiert und im entsprechenden Lysepuffer gewaschen (4 mal, 13000xg, 5 min, 4°C). Der letzte Waschschrift wurde mit dem *low salt*-Puffer durchgeführt, die Sepharose im reduzierenden 1xSDS-Probenpuffer resuspendiert und für 10 min bei 95°C aufgekocht. Die IP Ansätze wurden anhand von SDS-PAGE miteinander verglichen.

2.5.9.4 Immunpräzipitation mittels direkt gekoppelter Sepharose

Vor der eigentlichen IP wurde, wie bereits für die IP mit Protein A-Sepharose beschrieben, ein *Preclear* für 5 h bei 4°C im MACSMix durchgeführt. Dazu wurde äquilibrierte Sepharose CL-4B und die Membranfraktion der UZ eingesetzt. Nach dem *Preclear* wurde der Überstand zur IP mit 100 µl gekoppelter rCD303-Sepharose bzw. rHA/Fc-Sepharose (vgl. Kapitel 2.5.1) über Nacht verwendet. Nach der IP wurde die Sepharose 7 mal mit nativen Lysepuffer und 3 mal mit dem *low salt*-Puffer gewaschen (13000xg, 5 min, 4°C). Anschließend wurde der jeweilige IP-Ansatz in 100 µl des 0,2%igen RapiGest aufgenommen und für 6 min bei 99°C zur Freisetzung interagierender Proteine gekocht. Die Komplexität der Eluatfraktion wurde anhand von SDS-PAGE und Silberfärbung analysiert und die Proteine mit Hilfe der QTOF-Technologie von A. Frei identifiziert (vgl. Kapitel 2.5.10).

2.5.10 Ligand-based Receptor Capturing (LRC) und massenspektrometrische QTOF-Proteinanalyse

Die RapiGest-Eluatfraktionen der oben beschriebenen Immunpräzipitationsansätze wurde in einer Kooperation mit Hilfe der QTOF-Methode von A. Frei aus der Arbeitsgruppe von Dr. B.

Wollscheid der ETH Zürich analysiert. Ebenso etablierte A. Frei die LRC-Methode (Frei *et al.*, 2012), die zur Identifikation des CD303-Liganden eingesetzt wurde. Sie basierte auf der Querverletzung von rCD303 mit CD303L⁺ Zellen und anschließender massenspektrometrischer Analyse der interagierenden Proteine.

2.6 Magnetische Zellseparation (MACS)

Die MACS-Technologie ermöglicht eine schnelle und zuverlässige Zellseparation anhand spezifischer Oberflächenmarker (Miltenyi *et al.*, 1990; Radbruch *et al.*, 1994; Abts *et al.*, 1989). Im Prinzip wurden monoklonale Antikörper kovalent an superparamagnetische MicroBeads gekoppelt. Einzelzellsuspensionen wurden magnetisch durch eine Inkubation mit diesen Beads markiert. Im Falle einer Markierung mit spezifischen MicroBeads konnten die Zellen nach einem Waschschrift positiv mit Hilfe von magnetischen Säulen angereichert oder unmarkiert im Durchfluss gesammelt werden (*untouched* Separation). Nach der Separation wurde die Reinheit der Zellen am Durchflusszytometer bestimmt. Im Allgemeinen wurden Reinheiten von > 90% erreicht. Zur Optimierung der Reinheitseffizienz in einzelnen Fällen wurde eine anschließende FACS-Sortierung durchgeführt.

Die für die magnetische Anreicherung verwendeten Kits wurden von Miltenyi Biotec bezogen.

2.7 Durchflusszytometrie

Die durchflusszytometrische Analyse von Zellen oder Partikeln beruht auf deren physikalischen und immunologischen Charakteristika. Neben ihren Streuungseigenschaften wurden die Zellen durch Fluorochrom-konjugierte Antikörper innerhalb eines flüssigen Stroms untersucht.

2.7.1 Färbung mit Fluoreszenz-markierten Antikörpern

Generell erfolgte die Färbung für die durchflusszytometrische Analyse mit Fluoreszenz-markierten Antikörpern nach Herstellerangaben. Im Prinzip wurden ca. 1×10^6 Zellen in 100 μ l des PEB-Puffers resuspendiert und mit Antikörper-Konjugaten in der empfohlenen Verdünnung für 10 min bei 4°C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit 1 ml des PEB-Puffers gewaschen (300xg, 10 min, 4°C) und im entsprechenden Volumen für die Messung am Durchflusszytometer aufgenommen. Zur Diskrimination von toten Zellen wurde Propidiumjodid (PI) in einer Konzentration von 0,5 μ g/ml dazugegeben. Isotypkontrollen oder

sekundäre Antikörperkonjugate wurden als negative Kontrolle für die Antikörperfärbung eingesetzt.

2.7.2 CD303L-Färbung mit rCD303

Zum Nachweis des CD303L auf der Zelloberfläche von Zielzellen wurden ca. 1×10^6 Zellen in 100 μ l des Ca^{2+} -haltigen HBSS-Puffers resuspendiert und mit entsprechender Verdünnung des rCD303-Proteins (standardmäßig mit 2,5 μ g/ml) für 10 min bei 4°C inkubiert. Danach wurden die Zellen durch die Zugabe von 1 ml HBSS gewaschen (300xg, 10 min, 4°C) und mit dem Sekundärreagenz anti-HA-PE, der an den HA-Tag des rCD303-Proteins bindet, in einer Verdünnung von 1:11 im HBSS-Puffer für 10 min bei 4°C gefärbt. Nach dem anschließenden Waschschrift (1 ml HBSS-Puffer, 300xg, 10 min, 4°C) wurden die Zellen in einem angemessenen Messvolumen in HBSS aufgenommen und am MACSQuant *Analyzer* gemessen.

2.7.3 FACS-Sortierung

Zur Steigerung der Reinheit von Sca-1⁺ und Sca-1⁻ PDCs wurden die Zellen nach der Fluoreszenz-Markierung mithilfe der FACS-Sortierung entsprechend der Sca-1-Expression angereichert. Eine detaillierte Färbestrategie ist den Abbildungslegenden im Ergebnisabschnitt zu entnehmen. Die FACS-Sortierung wurde in folgenden Einrichtungen durchgeführt:

Institut für Genetik der Universität zu Köln

Research facility FACS analysis

Durchführung: C. Göttlinger am FACSVantage, BD

Zentrum für Molekulare Medizin der Universität zu Köln (ZMMK)

Central Cell Sort Facility

Prof. Dr. H. Abken

Durchführung: Dr. G. Rappl am FACS ARIA III, BD

2.7.4 Messung von Th1/Th2/Th17-Zytokinen

Die Bestimmung der murinen Th1/Th2/Th17-Zytokinkonzentrationen in Zellkulturüberständen nach Stimulation von Sca-1⁺ und Sca-1⁻ PDCs erfolgte nach Herstellerangaben des spezifischen CBA Kits mit Hilfe der Durchflusszytometrie am MACSQuant *Analyzer*.

3. Ergebnisse

In Zusammenhang mit unkontrollierter Ausschüttung von Interferon-alpha (IFN- α) durch plasmazytoide dendritische Zellen (PDCs), was als Hauptursache von vielen Autoimmunerkrankungen bekannt ist, sollte der Ligand von CD303 zu potentiellen Therapie Zwecken isoliert und charakterisiert werden.

3.1 Herstellung und Qualitätskontrolle des rCD303-Proteins und des rHA/Fc-Kontrollproteins

Zur Isolation des CD303L wurden viele verschiedene Methoden eingesetzt, die auf der Herstellung des rekombinanten CD303-Proteins (rCD303) basierten. Die extrazelluläre Domäne von CD303 wurde an zwei *Tags* fusioniert (vgl. Kapitel 2.4.1 und 2.4.1.1). Zum einen verwendete man den HA-*Tag*, der vom humanen Influenzavirus-Protein Hemagglutinin abgeleitet wurde. Zum anderen wurde ein Fc-*Tag* hergestellt, welcher aus der konstanten Kette des humanen IgG1-Antikörpers bestand. Beide *Tags* dienten sowohl zu Aufreinigungs- als auch zu Nachweiszwecken des rCD303-Proteins. Um unspezifische Bindungen der *Tags* zu kontrollieren, wurde ein rekombinantes Protein (rHA/Fc) generiert, das nur aus den beiden *Tags* bestand (vgl. Kapitel 2.4.1 und 2.4.1.1). Die Klonierung von rCD303 und rHA/Fc, ebenso wie die Optimierung des Produktionsprozesses in prokaryotischen bis hin zu eukaryotischen Zelllinien, erfolgte durch B. Kolbe und ist detailliert in seiner Diplom- bzw. Doktorarbeit beschrieben (Kolbe, 2004; Kolbe, 2010). Basierend auf der Herstellung der rekombinanten Proteine, wurden die ersten Analysen dieser Arbeit in enger Zusammenarbeit mit B. Kolbe durchgeführt und sind entsprechend gekennzeichnet.

Am Ende des Optimierungsprozesses wurden rCD303 und rHA/Fc in der eukaryotischen Zelllinie CHO DG44 produziert, wodurch eine effiziente posttranslationale Modifikation gewährleistet wurde. Aufgrund der Anwesenheit eines Signalpeptids wurden die synthetisierten Proteine in den Zellkulturüberstand sezerniert, welcher in großen Mengen gesammelt wurde. Die Aufreinigung der Proteine erfolgte über Affinitätschromatographie. Im ersten Schritt wurde Protein A an Sepharose als Matrixträger gekoppelt. Protein A bindet an die Fc-Region der Immunglobuline und somit auch an den Fc-*Tag* von rCD303 und rHA/Fc, wodurch eine spezifische Anreicherung der Proteine aus dem Zellkulturüberstand erreicht wurde. Die Effizienz der rCD303-Proteinaufreinigung konnte sequentiell mit einer zweiten Säule gesteigert werden. Diese bestand ebenfalls aus Sepharose, die an den CD303-spezifischen Antikörper AC144 gekoppelt war. Abb. 5 zeigt den Optimierungsprozess der CD303-Aufreinigung. Durch den zweiten Aufreinigungsschritt über die AC144-Sepharose

konnte rCD303 sauber und ohne Abbruchfragmente aufgereinigt werden (Abb. 5, AC144-Elu.). Die Aufreinigung von rHA/Fc erfolgte ausschließlich über die Protein A-Sepharose Affinitätschromatographie (Abb. 7).

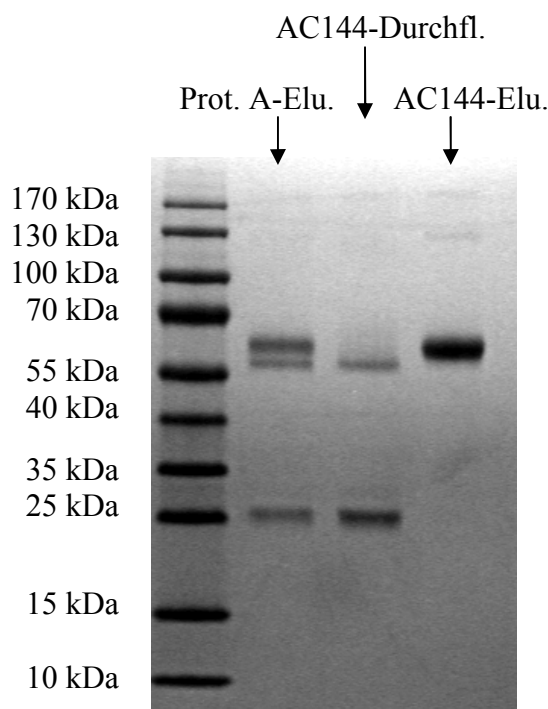


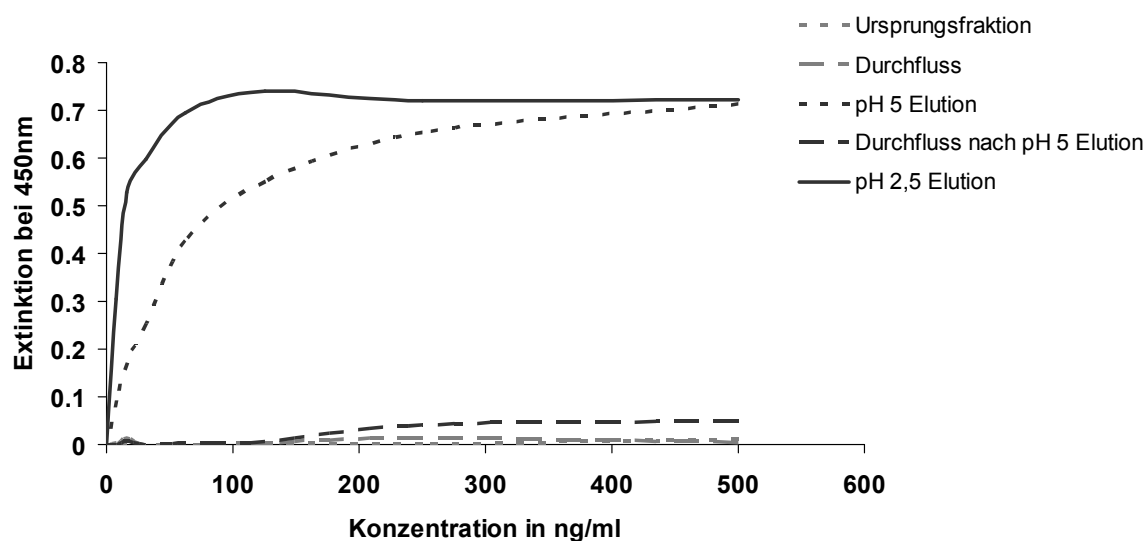
Abbildung 5. rCD303-Aufreinigung mit Hilfe der Affinitätschromatographie

CHO DG44-Zellen wurden mit dem CD303-Konstrukt transfiziert. Das nach der Proteinsynthese in den Zellkulturüberstand sezernierte rCD303-Protein wurde über zwei hintereinander geschaltete Sepharose-Säulen aufgereinigt. Im ersten Schritt wurde der *Fc-Tag* spezifisch von der Protein A-Sepharose gebunden. Nach der Elution des gebundenen Proteins durch die Zugabe von saurem Elutionspuffer wurde diese Fraktion über die AC144-Sepharose, welche spezifisch die CD303-Domäne erkannte, aufgereinigt. Auch hier erfolgte die Elution mit saurem Elutionspuffer. Folgende Fraktionen wurden mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) auf dem SDS-Gel, welches anschließend mit Coomassie gefärbt wurde, analysiert: Elution von der Protein A-Sepharose (Prot. A-Elu.), Durchfluss von der AC144-Sepharose (AC144-Durchfl.) und Elution von der AC144-Sepharose (AC144-Elu.) Die Durchführung erfolgte in Zusammenarbeit mit B. Kolbe.

Die Elution der rekombinanten Proteine von der Sepharose basierte auf einer pH-Verschiebung. Deshalb sollte im nächsten Schritt getestet werden, welcher pH-Wert zu einer optimalen Ausbeute und einer guten Funktionalität der Proteine führt. Elutionspuffer mit einem pH-Wert von 5 und 2,5 wurden im Vergleich gegeneinander getestet. Bei der Aufreinigung von rCD303 folgte nach einer ersten Elution mit pH 5 eine zweite Elution derselben AC144 Säule mit pH 2,5. Die Ausbeute und Bindungsaffinität der entsprechenden protein-

haltigen Fraktionen wurde anschließend in spezifischen enzymgekoppelten Immunadsorptionstests (*enzyme-linked immunosorbent assay*, ELISA) untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass die Elution mit pH 2,5 im Vergleich zu pH 5 höhere Proteinausbeuten mit besseren Bindungseigenschaften von rCD303 an den CD303-spezifischen Antikörper AC144, der als Fangantikörper im ELISA eingesetzt wurde, aufwies (Abb. 6A). Die Detektion des gebundenen rCD303-Proteins erfolgte über den HA-Tag, der erfolgreich und funktionell nachgewiesen werden konnte. Die Qualitätskontrolle des humanen Fc-Tags (hFc-Tag) wurde durch den Austausch des Fangantikörpers im ELISA durchgeführt. Es konnte bestätigt werden, dass das rCD303-Protein der pH 2,5-Elutionsfraktion auch über den hFc-Tag sehr gute Bindungseigenschaften zum spezifischen Antikörper hatte (Abb. 6B). Ebenso konnte das rHA/Fc-Protein spezifisch in einem ELISA mit dem eingesetzten Fangantikörper α -human IgG (Fc)-UNLB nicht aber, wie erwartet, mit AC144 aufgrund der fehlenden CD303-Domäne nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt).

(A)



(B)

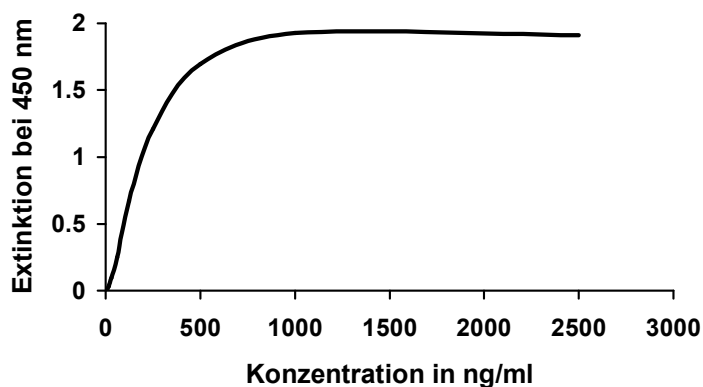


Abbildung 6. rCD303-spezifischer ELISA

rCD303 wurde aus Zellkulturüberständen von CHO DG44-Suspensionszellen affinitätschromatographisch mittels AC144-Sepharose gebunden und anschließend aufgrund einer pH Verschiebung eluiert. Zuerst wurde ein Elutionspuffer mit dem pH-Wert 5 verwendet. Danach wurden die restlichen noch an der Säule gebundenen Proteine im nächsten Schritt mit pH 2,5 eluiert. Die Bindungseigenschaften von rCD303 aus den jeweiligen Fraktionen an spezifische Antikörper sind dargestellt.

(A) Je 5 µg/ml des Fangantikörpers AC144 wurden in 1xPBS pro Well einer 96-Well Platte über Nacht beschichtet. Nach dem Blocken der unspezifischen Bindestellen mit 1% BSA in 1xPBS für 2 h wurden unterschiedliche Proteinkonzentrationen der jeweiligen Aufreinigungsfractionen für 1 h inkubiert. Die Detektion des gebundenen rCD303-Proteins erfolgte durch das α -HA-HRP-Konjugat (1:10000), welches die Umsetzung des präzipitierenden Farbstoffsubstrats TMB zum optisch sichtbaren Produkt katalysierte. Nach Zugabe von 10%iger Schwefelsäure wurde die enzymatische Reaktion gestoppt und die Extinktion des Endprodukts bei 450 nm gemessen.

(B) Anstelle des in A beschriebenen AC144-Antikörpers wurde Maus α -human IgG (Fc)-UNLB (Klon JDC-10) als Fangantikörper, der gegen den hFc-Tag gerichtet war, um die Bindungseigenschaft von rCD303 über den hFc-Tag zu kontrollieren, eingesetzt. In diesem Experiment wurde ausschließlich die pH 2,5 Elutionsfraktion getestet.

Zur weiteren Untersuchung der Bindungseigenschaften von Antikörpern an den HA- und hFc-Tag wurde die Western Blot-Analyse durchgeführt. Die aufgereinigten Proteine wurden zuerst mit Hilfe von SDS-PAGE aufgrund des Molekulargewichtes elektrophoretisch aufgetrennt und anschließend auf die PVDF-Membran zur Western Blot-Analyse übertragen. Sowohl der HA-Tag als auch der hFc-Tag von rCD303 und von rHA/Fc konnte aufgrund einer spezifischen Detektion mit einem α -HA und einem α -hIgG Fc-Antikörper nachgewiesen werden (Abb. 7). Beide Proteine konnten hauptsächlich als monomere Strukturen charakterisiert werden und massenspektrometrische Analysen bestätigten die Identität von rCD303 und rHA/Fc. rCD303 lief im SDS-Gel bei ca. 66 kDa und rHA/Fc bei ca. 36 kDa. Weiterhin detektierte man trotz denaturierender und reduzierender Bedingungen auch geringe Mengen an hochmolekularen Komplexen. rCD303 bildete sowohl Di- als auch Trimere und bei rHA/Fc konnten nur dimere Strukturen (ca. 72 kDa) nachgewiesen werden. Das durch die elektrophoretischen Laufeigenschaften bestimmte Molekulargewicht der monomeren rCD303 und rHA/Fc-Proteine entsprach nicht den errechneten Werten. Für rCD303 wurde ein Molekulargewicht von 48,7 kDa und für rHA/Fc eins von 28,5 kDa errechnet. Die tatsächliche molekulare Größe der Proteine (Abb. 7) könnte mit einer erhöhten posttranslationalen Modifikation zusammenhängen (Spiro, 1973). Dabei spielt die Glykosylierung eine enorme Rolle. Diese wird im Zusammenhang mit rCD303 und rHA/Fc ausführlich in Kapitel 3.2.2 untersucht.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass sowohl rCD303 als auch rHA/Fc erfolgreich und funktionell in Zusammenarbeit mit B. Kolbe zur Isolation des CD303L hergestellt werden konnten.

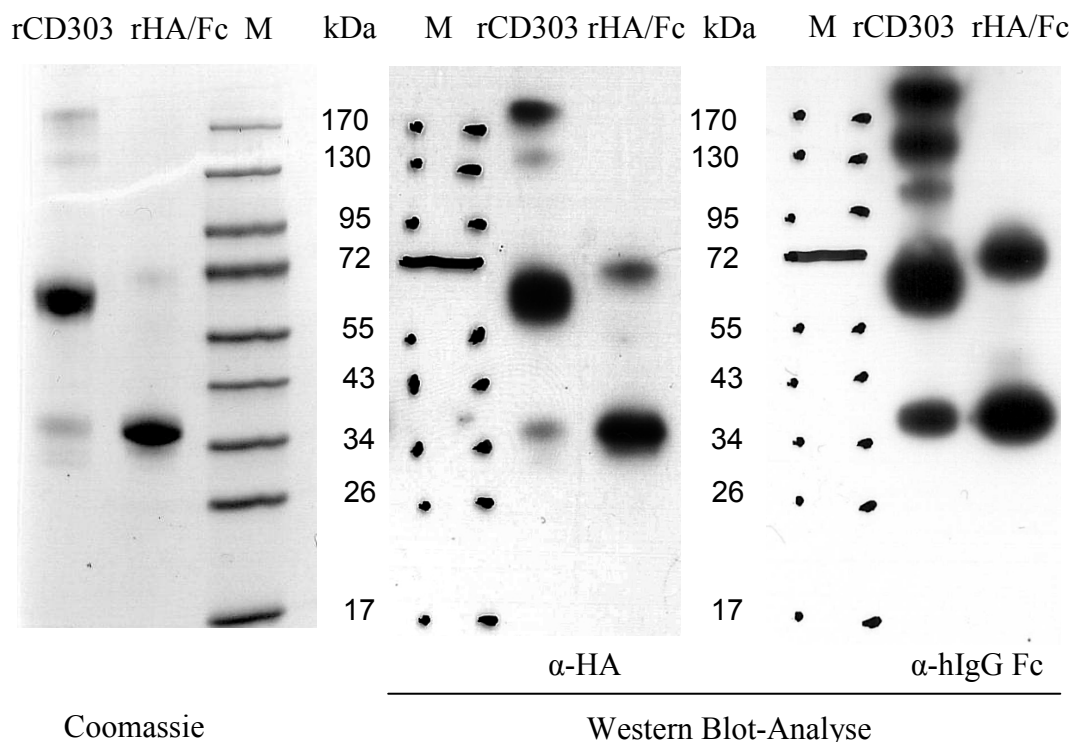


Abbildung 7. SDS-PAGE und Western Blot-Analyse von rCD303 und rHA/Fc

2,5 μ g (Coomassie) bzw. 0,25 μ g (Western) rCD303 und rHA/Fc wurden größenmäßig auf einem 10-20%igen Tris-Glycin SDS-Gel elektrophoretisch unter reduzierten Bedingungen aufgetrennt. Zum einen wurden die Proteine mit Hilfe der Coomassie-Färbelösung sichtbar gemacht. Zum anderen wurden rCD303 und rHA/Fc spezifisch im Western Blot über α -HA-HRP (1:10000) bzw. über α -hIgG Fc-Biotin- (1:10000) und Streptavidin-POD-Konjugate (1:10000) chemilumineszent mittels ECL-Substrat nachgewiesen.

Um den Klon mit der höchsten rCD303-Produzentenrate zu ermitteln, wurde eine Subklonierung (*limiting dilution*) bei der zwei Klone hochwuchsen, die detektierbare Mengen an rCD303 produzierten und in Zellkulturüberstände sezernierten, durchgeführt (Abb. 8). Es handelte sich dabei um die Subklone 5C4 und 3E7, die zur weiteren rCD303-Proteinproduktion kultiviert wurden. Im Allgemeinen konnten ca. 1 mg Protein pro 1 L Zellkulturüberstand aufgereinigt werden.

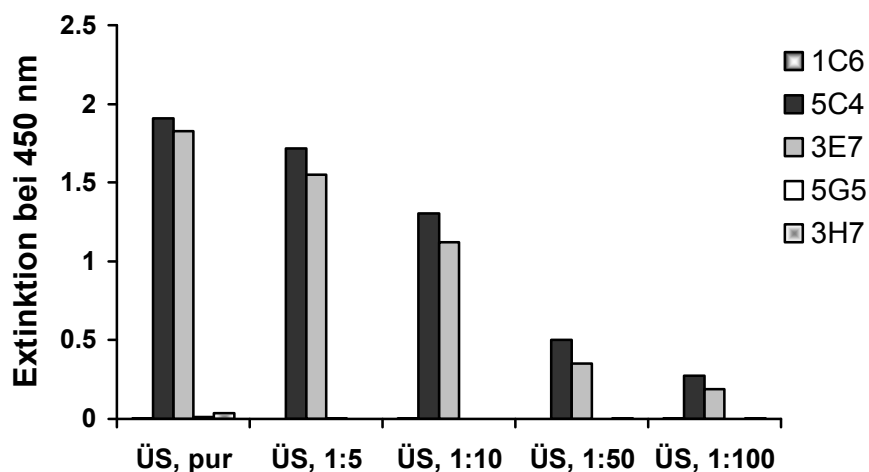


Abbildung 8. Subklonierung der rCD303-Produzenten führte zu zwei produktiven Klonen

Je 100 µl von purem bzw. 1:5, 1:10, 1:50 und 1:100 verdünntem Zellkulturüberstand (ÜS) wurden für einen spezifischen rCD303-ELISA, bei dem 5 µg/ml von α -human IgG (Fc)-UNLB als Fangantikörper und α -HA-HRP (1:10000) als Detektionskonjugat verwendet wurden, eingesetzt.

3.2 Charakterisierung von rCD303 und rHA/Fc

3.2.1 Proteinstabilität

Nachdem die Aufreinigungsstrategie von rCD303 und rHA/Fc optimiert wurde, wurde geprüft, wie stabil die Proteine bei verschiedenen Lagerungszuständen sind. Da für die anstehenden Experimente zur Isolation des CD303L viele biologische Prozesse bei 37°C stattfinden, musste gewährleistet werden, dass rCD303 auch bei dieser Temperatur intakt und funktionell bleibt. Zu diesem Zweck wurde rCD303 für unterschiedliche Zeitpunkte (15 h, 24 h und 48 h) bei 37°C inkubiert. Weiterhin wurden folgende Konditionen untersucht: Lagerung bei 4°C, bei Raumtemperatur (RT), bei -70°C und 3-faches Einfrieren und Auftauen (F&T) des Proteins. Anschließend wurde dessen Stabilität in der SDS-PAGE und im Western Blot in Hinsicht auf Bindungseigenschaften und Anwesenheit von Abbruchfragmenten untersucht. Wie man anhand Abb. 9 erkennen kann, bleibt rCD303 bei allen getesteten Bedingungen stabil. Es sind keine Abbruchfragmente sowohl im Coomassie-gefärbten Proteingel als auch im sensitiveren Western Blot zu detektieren.

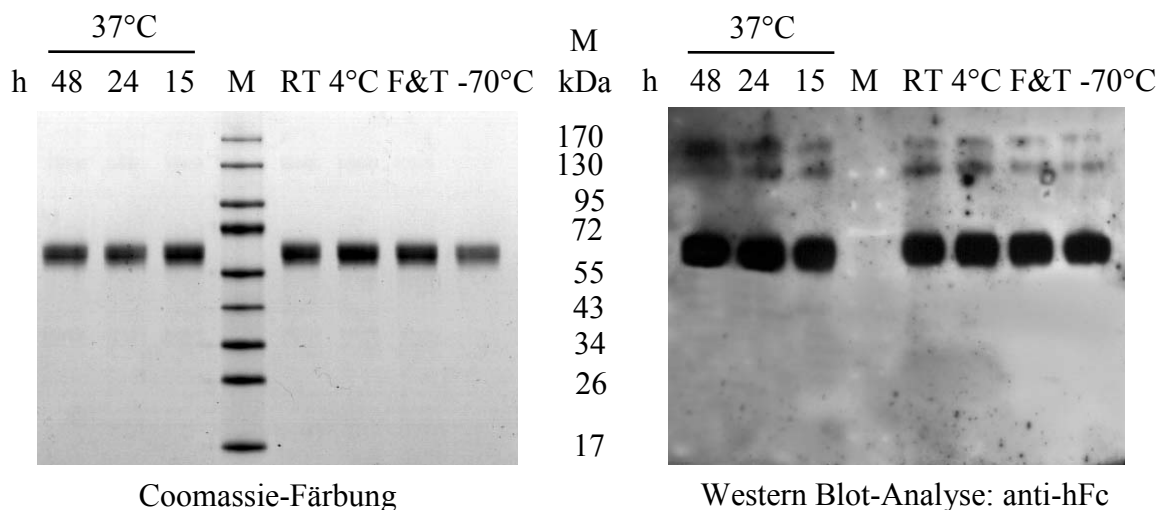
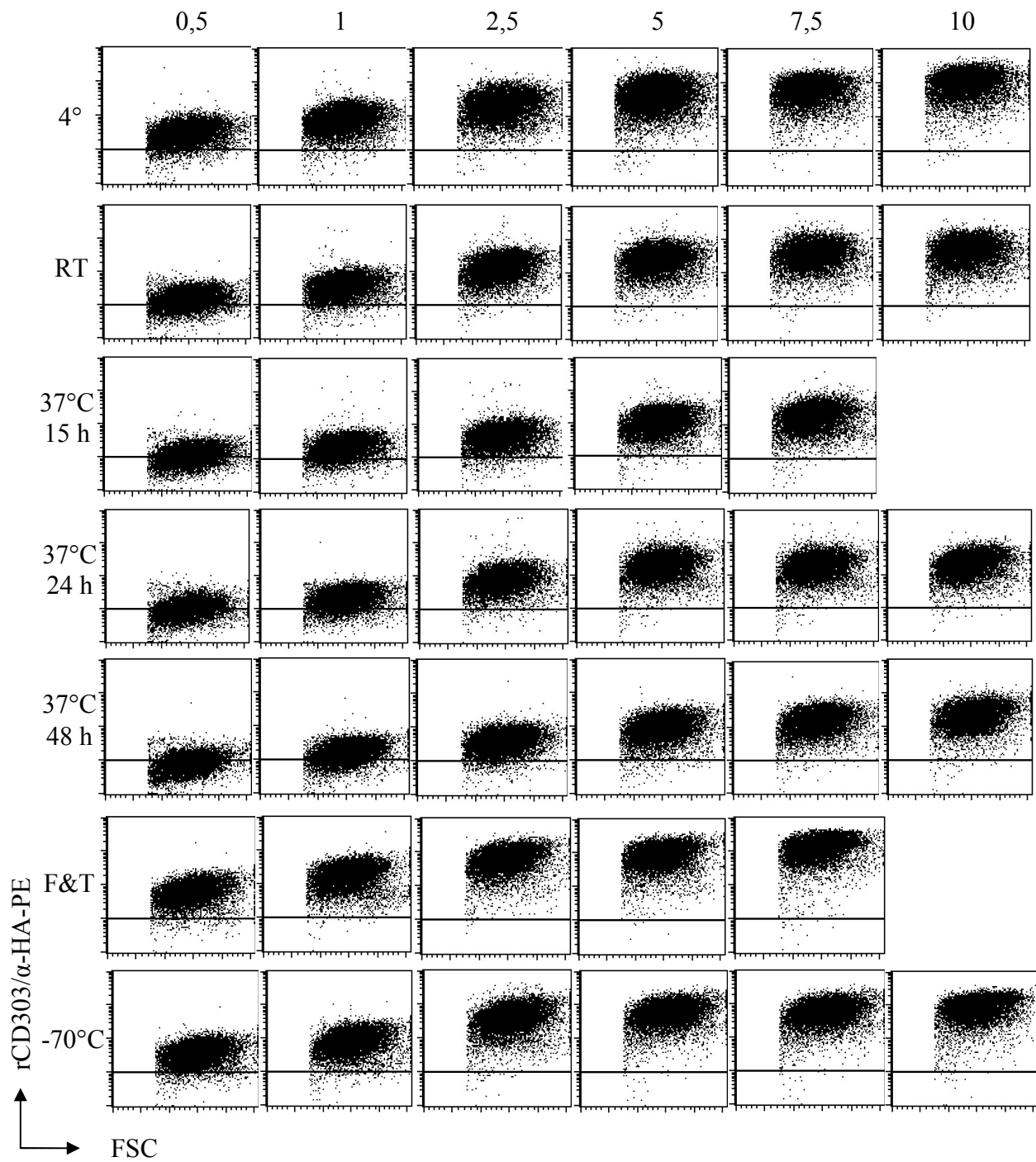


Abbildung 9. rCD303 bleibt unter verschiedenen Temperaturbedingungen stabil

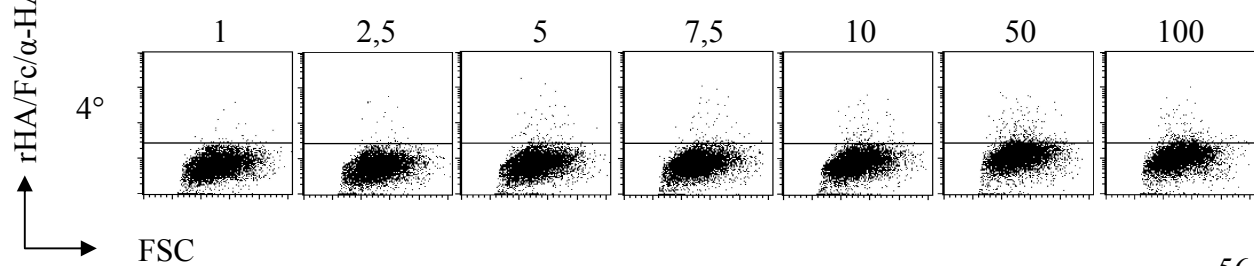
Je 2,5 µg des unter verschiedenen Bedingungen behandelten Proteins wurden auf einem 10-20%igen Tris-Glycin-Gel aufgetrennt und mit Coomassie sichtbar gemacht. Analog dazu wurden 0,25 µg des Proteins für eine Western Blot-Analyse eingesetzt, bei dem der Nachweis, wie in Abb. 7 beschrieben, über den humanen Fc-Tag erfolgte.

Die Proteinanalyse zeigte, dass rCD303 bei diversen Temperaturen nicht abgebaut wird. Es stellte sich als nächstes die Frage, ob die Funktionalität des Proteins in der Zellanalyse beeinträchtigt wurde. Zu diesem Zweck wurde die Melanomzelllinie SK-MEL-5 für durchflusszytometrische Analysen eingesetzt. Zuerst konnte gezeigt werden, dass rCD303 (Abb. 10A, 4°C) nicht aber rHA/Fc (Abb. 10B, 4°C) an die Zelloberfläche von SK-MEL-5-Zellen in einer konzentrationsabhängigen Art und Weise bindet. Das deutet darauf hin, dass SK-MEL-5-Zellen einen CD303L exprimieren, der von rCD303 gebunden wird. Bereits ein Einsatz von 0,5 µg/ml des rCD303-Proteins führte zu einer sehr guten Ligandenfärbung. Die Bindungsaffinität ist somit mit einer Antikörper-Antigen-Bindung vergleichbar. Dass diese Interaktion spezifisch und selektiv über die CD303-Domäne vermittelt wurde, zeigte die Färbung mit dem rHA/Fc-Protein, bei dem der Einsatz eines 400-fachen molaren Überschusses zu keiner Ligandenfärbung geführt hat (Abb. 10B). Bei der Betrachtung der Bindungsaffinitäten unterschiedlich behandelter Proteine fiel auf, dass eine steigende Lagerungstemperatur die Funktionalität der Proteine negativ beeinflusst. Trotzdem konnte man beim Einsatz von 1-2,5 µg/ml des rCD303-Proteins eine überzeugende CD303L-Färbung detektieren, sodass biologische Untersuchungen bei 37°C durchgeführt werden konnten. Tieferen Temperaturen haben, wie erwartet, keine Auswirkungen auf die Stabilität des Proteins. Aus diesem Grund wurde rCD303 kurzzeitig bei 4°C und langfristig bei -70°C in Aliquots gelagert. In Abb. 10C sind die durchschnittlichen Fluoreszenzintensitäten der Ligandenfärbung, die aus den Daten der Abb. 10A hervorgehen, graphisch gezeigt.

(A)

rCD303 in $\mu\text{g/ml}$:

(B)

rHA/Fc in $\mu\text{g/ml}$:

(C)

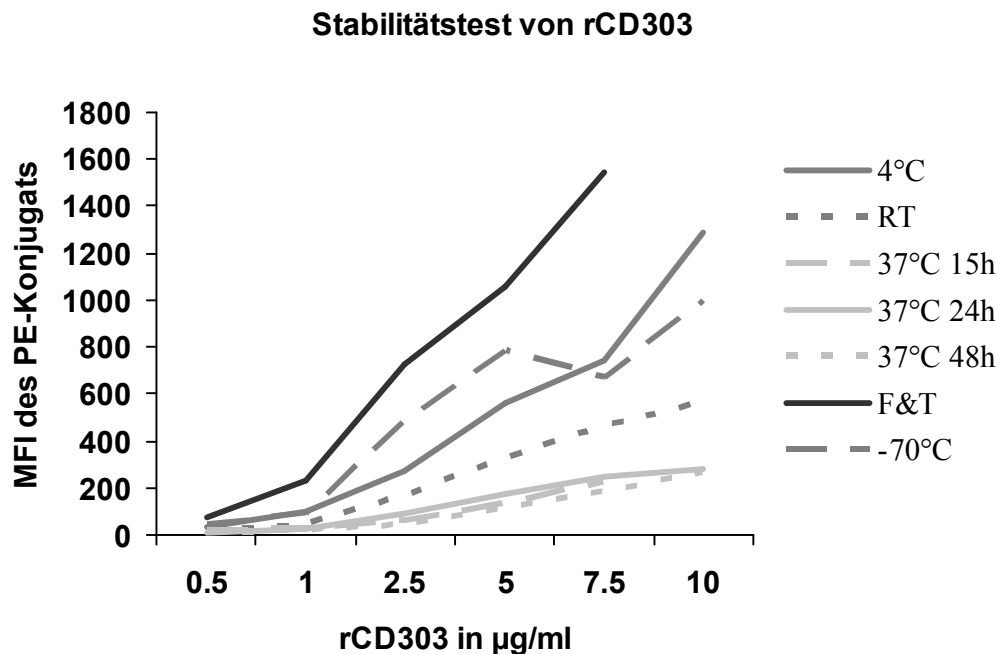


Abbildung 10. Stabilität und Funktionalität von rCD303 unter verschiedenen Temperaturbedingungen

(A) Jeweils 50 µg des rCD303-Proteins wurden unterschiedlichen Bedingungen wie 4°C, Raumtemperatur (RT), 37°C für 15 h, 24 h bzw. 48 h, 3-faches Auftauen und Einfrieren (F&T) und -70°C ausgesetzt. Anschließend wurden die behandelten Proteine in aufsteigenden Konzentrationen (0,5-10 µg/ml) in der Durchflusszytometrie zur extrazellulären Färbung von CD303L auf SK-MEL-5-Zellen verwendet. Die jeweiligen Färbungen sind abgebildet.

(B) Das Kontrollprotein rHA/Fc wurde nach der affinitätschromatographischen Aufreinigung bei 4°C gelagert und in unterschiedlichen Konzentrationen zur durchflusszytometrischen Analyse auf SK-MEL-5-Zellen eingesetzt.

(C) Die durchschnittliche Fluoreszenzintensität (MFI) der in A gezeigten Ligandenfärbung ist dargestellt.

3.2.2 Glykosylierung der rekombinanten Proteine

Die posttranslationale Modifikation der Proteine nach der Proteinbiosynthese ist ein wichtiger Prozess bei der Reifung von Proteinen. Die Glykosylierung spielt dabei eine wichtige Rolle. Deren Ausmaß auf die Herstellung von rCD303 und rHA/Fc wurde nun genauer untersucht, da bereits anhand der SDS-PAGE festgestellt wurde, dass sowohl rCD303 als auch rHA/Fc ein größeres tatsächliches Molekulargewicht aufwiesen als es berechnet wurde (vgl. Abschnitt 3.1, Abb. 7). Mit Hilfe des Enzyms PNGase F [Peptid-N⁴-(N-acetyl-β-glucosaminyl)-Asparagin-Amidase] können N-glykosidische Bindungen gespalten werden. Der Proteinverdau mit PNGase F zeigte, dass sowohl von rCD303 als auch von rHA/Fc N-verlinkte Zucker

abgespalten werden konnten. Nach dem PNGase F-Verdau verringerte sich das Molekulargewicht des rCD303-Proteins von 66 kDa auf 50 kDa, was annähernd dem errechneten Molekulargewicht von 48,7 kDa entsprach. Das Molekulargewicht von rHA/Fc minimierte sich von 36 kDa auf ca. 34 kDa und das der RNase B, die als positive Kontrolle für den erfolgreichen enzymatischen Verdau der einzigen N-Glykosylierungsstelle eingesetzt wurde, von 19 kDa auf 17 kDa (Abb. 11A).

Um zu definieren, welche Fusionsdomäne der rekombinanten Proteine den meisten Zuckeranteil trägt, wurde eine zweite Endoglykosidase hinzugezogen, die ebenfalls N-verlinkte Zucker von Asparaginresten abspaltet. Die Endoglykosidase IgGZERO hat eine hohe Spezifität für native IgG und entfernt Zucker spezifisch von der CH-Domäne der schweren Fc-Kette. Nach dem IgGZERO-Verdau wurde keine große Molekulargewichtsveränderung beim rCD303-Protein beobachtet. Ebenso ähnelte das Bandenmuster von rHA/Fc vor und nach dem Verdau dem der PNGase F-Analyse (Abb. 11B). Daraus ließ sich schlussfolgern, dass die CD303-Domäne des rCD303-Fusionsproteins den größten Anteil an N-verknüpften Zuckern trug.

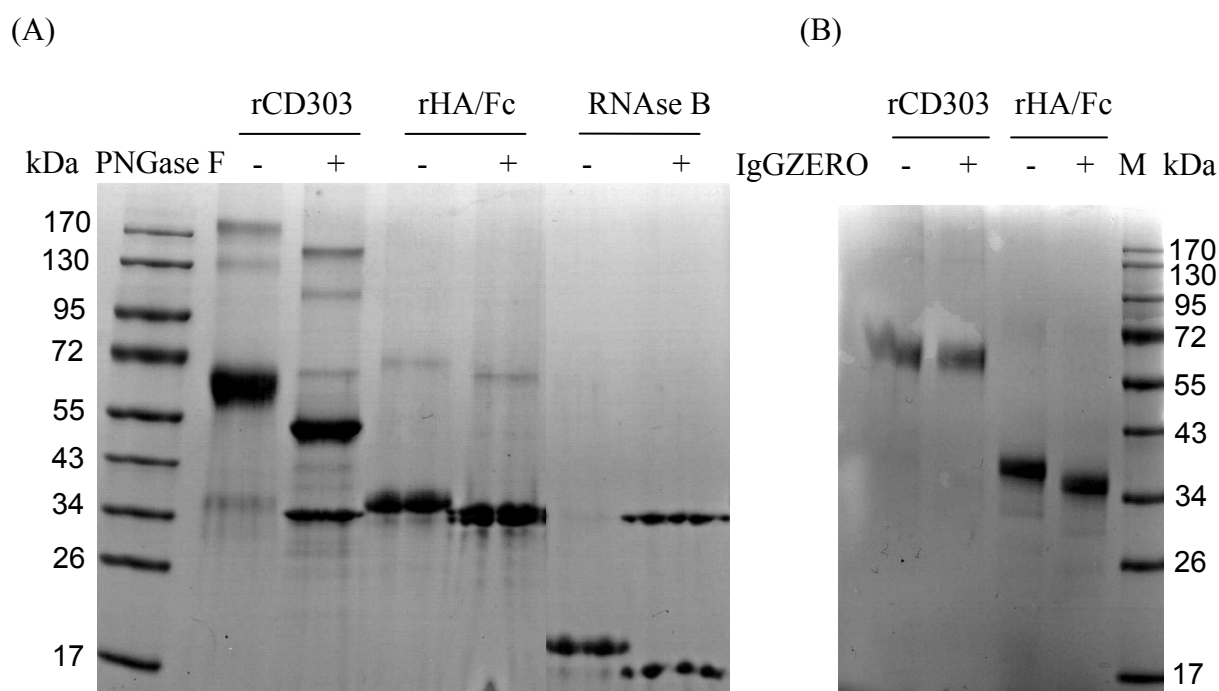


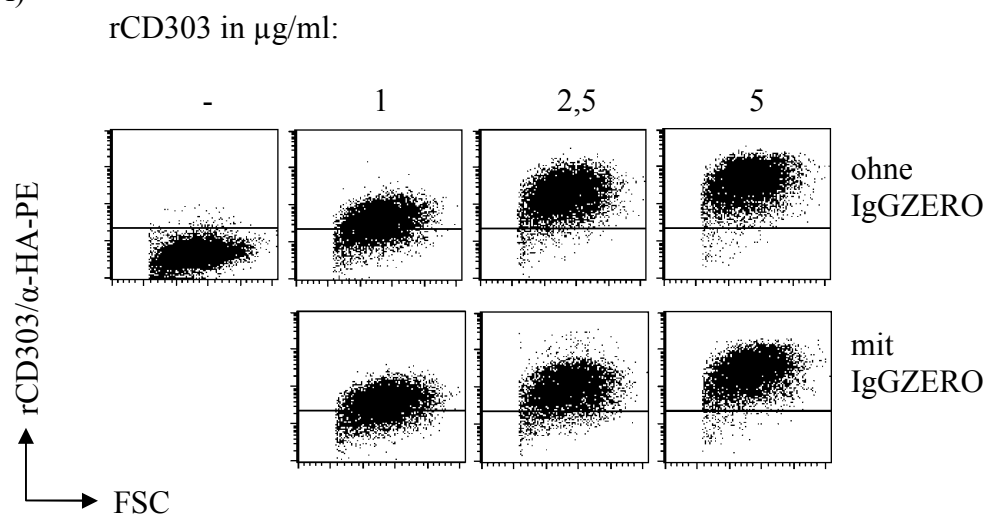
Abbildung 11. N-Glykosylierung von rCD303 und rHA/Fc

(A) Jeweils 2,5 µg des rCD303-, rHA/Fc- und RNase B-Proteins wurden gemäß Herstellerprotokoll mit PNGase F verdaut und mittels SDS-PAGE auf einem Coomassie-gefärbten Gel analysiert. PNGase F läuft bei ca. 34 kDa und ist in allen mit „+“-gekennzeichneten Proben detektierbar. Unbehandelte Proben sind mit einem „-“ markiert.

(B) Jeweils 2,5 µg von rCD303 und rHA/Fc wurden mit IgGZERO verdaut und wie in A beschrieben untersucht.

Um zu untersuchen, welchen Einfluss die Zuckermodifizierungen der CD303-Domäne auf die CD303L-Bindung haben, wurden die behandelten Proteine in der Durchflusszytometrie eingesetzt. Dabei wurden SK-MEL-5-Zellen mit unterschiedlichen Konzentrationen des PNGase F (Abb. 12B) bzw. IgGZERO (Abb. 12A) behandelten bzw. unbehandelten rCD303-Proteins extrazellulär gefärbt. Es konnte gezeigt werden, dass die Bindung von rCD303 an den Liganden auf der Oberfläche von SK-MEL-5-Zellen unabhängig von N-verlinkten Zuckermodifikationen auf rCD303 war.

(A)



(B)

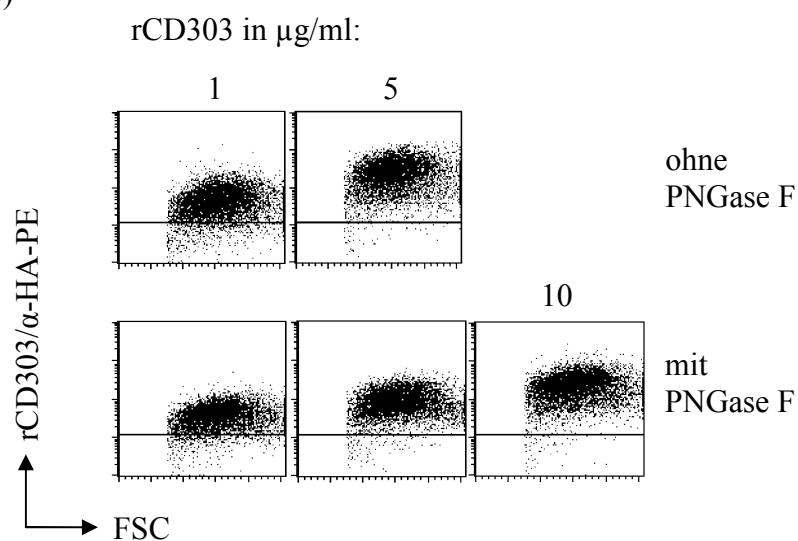
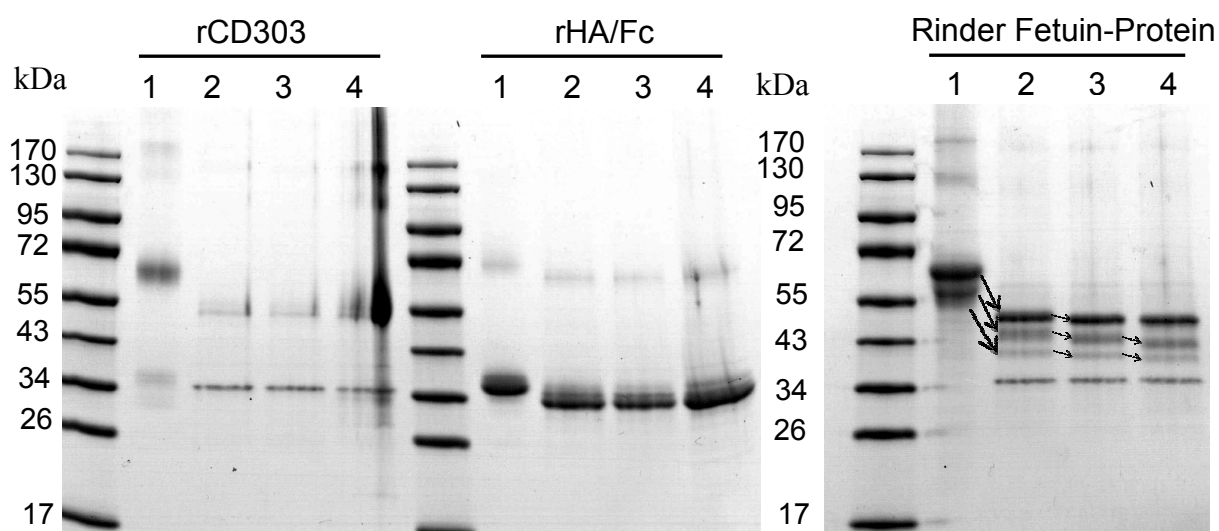


Abbildung 12. Einfluss der Deglykosylierung von rCD303 auf die Interaktion zwischen rCD303 und CD303L

SK-MEL-5-Zellen wurden mit aufsteigender Konzentration von rCD303, welches entweder mit IgGZERO (A) bzw. PNGase F (B) enzymatisch gespalten wurde, extrazellulär gefärbt. Unbehandeltes rCD303-Protein wurde dabei als Kontrolle eingesetzt.

Neben N-Glykosylierungen an Asparaginresten spielen O-Glykosylierungen an den Hydroxylgruppen der Aminosäuren Serin und Threonin eine wichtige Rolle bei der post-translationalen Modifikation von Proteinen. Wie zuvor bereits gezeigt werden konnte, wurde rCD303 sehr stark N-glykosyliert, was jedoch keinen Einfluss auf die CD303L-Färbung hatte. Um den Effekt der O-Glykosylierung zu untersuchen, wurden zuerst die N-verlinkten Zucker von rCD303, rHA/Fc und dem Rinder Fetuin Protein mit PNGase F entfernt. Anschließend wurden die verbliebenen Grundzuckerstrukturen durch die Entfernung der Sialinsäure freigelegt und danach mit O-Glycanase gespalten. Anhand Abb. 13 erkennt man, dass Zuckerstrukturen sowohl von rCD303 als auch von rHA/Fc zwar mit PNGase F aber nicht mit der O-Glycanase gespalten werden könnten. Es lässt sich für diese Proteine keine weitere Proteinbandenverschiebung im SDS-Gel nach Behandlung mit Sialidase A und O-Glycanase beobachten. Im Gegensatz dazu konnte anhand des Rinder Fetuin-Kontrollproteins bestätigt werden, dass die Enzyme funktionell sind. Es ließen sich Reduktionen des Molekulargewichtes nach jeder enzymatischen Behandlung des Rinder Fetuin-Proteins im SDS-Gel detektieren (Abb. 13, vgl. Pfeile).



- 1 = unbehandelt
- 2 = N-Glycanase
- 3 = N-Glycanase + Sialidase A
- 4 = N-Glycanase + Sialidase A + O-Glycanase

Abbildung 13. N- und O-Deglykosylierung und Desialysierung des rCD303-, des rHA/Fc- und des Rinder Fetuin-Proteins

Jeweils 3 µg vom rCD303-, rHA/Fc- und Rinder Fetuin-Protein wurden enzymatisch mit N-Glycanase [PNGase F (2)], mit einer Kombination von N-Glycanase und Sialidase A (3) oder mit einer Kombination von N-Glycanase, Sialidase A und O-Glycanase (4) verdaut und anschließend auf einem SDS-Gel elektrophoretisch größenmäßig aufgetrennt. Das Gel wurde danach mit Coomassie gefärbt, um die Proteine vor und nach der Deglykosylierung sichtbar zu machen. Die Veränderung des Molekulargewichtes des Rinder Fetuin-Proteins ist nach dem jeweiligen enzymatischen Verdau mit Pfeilen gekennzeichnet.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass rCD303 und rHA/Fc posttranslational N- aber nicht O-glykosyliert wurden. Bei rCD303 fand diese Modifikation, die nicht essentiell für die Ligandenbindung ist, hauptsächlich in der CD303-Domäne statt. Untersucht man die Aminosäuresequenz von rCD303 auf Sequenzmotive für N-Glykosylierungen (Asn-X-Ser/Thr), so stellt man fest, dass die CD303-Domäne drei potentielle N-Glykosylierungsstellen beinhaltet, die, wie man dem enzymatischen Verdau entnehmen kann, stark glykosyliert werden. In der Fc-Domäne detektiert man dagegen ein Sequenzmotiv, was sich ebenfalls mit den Ergebnissen der Deglykosylierungsstudien deckt.

3.2.3 Ca²⁺-abhängige CD303L-Bindung

C-Typ-Lektine werden, wie in der Einleitung beschrieben, durch eine Calcium-abhängige Bindung zu ihrem Liganden klassifiziert (Haagsman *et al.*, 1987; Norgard-Sumnicht *et al.*, 1993; O'Connell *et al.*, 1996; Weis *et al.*, 1998). Um zu überprüfen, ob diese Tatsache auch für CD303 zutrifft, wurde der Ligandennachweis auf SK-MEL-5-Zellen in unterschiedlichen Puffern durchgeführt. Dabei wurde der für die durchflusszytometrischen Analysen der CD303L-Färbung standardmäßig eingesetzte Ca²⁺-haltige HBSS-Puffer durch einen EDTA-haltigen Puffer ersetzt. Wie erwartet, konnte eine Ca²⁺-abhängige Bindung von rCD303 zu seinem Liganden nachgewiesen werden. Die Färbeintensität der CD303L-Färbung nahm im PEB-Puffer (PBS/EDTA/BSA) sehr stark ab. Sogar der Einsatz einer 10-fach höheren rCD303-Konzentration führte zu keinem aussagekräftigen CD303L-Nachweis (Abb. 14). Die Ca²⁺-abhängige Bindung könnte an einer veränderten Konformation von rCD303 nach Ca²⁺-Bindung liegen, wodurch eine höhere Affinität zu seinem Liganden im Gegensatz zum Ca²⁺-freiem Zustand bewirkt wird (Feinberg *et al.*, 2007). Ca²⁺ ist weiterhin für die Integrität der Kohlenhydrat-erkennenden Domäne (CRD) der C-Typ-Lektine essentiell und ist demzufolge ein wichtiger Bestandteil bei der weiteren experimentellen Durchführung zur Isolation des CD303L (Drickamer, 1999).

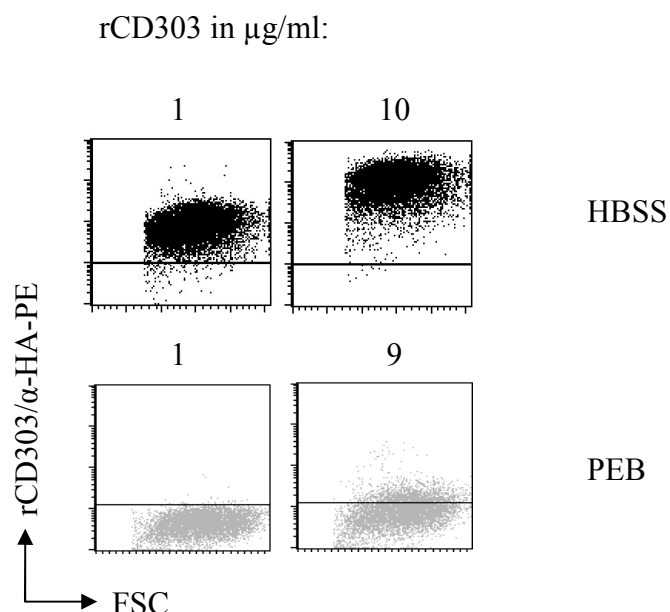


Abbildung 14. Ca^{2+} -abhängige Bindung von rCD303 an seinen Liganden auf SK-MEL-5-Zellen

SK-MEL-5-Zellen wurden mit 1 bzw. 9-10 $\mu\text{g/ml}$ rCD303 entweder in HBSS- oder PEB-Puffer für 10 min inkubiert. Der Nachweis der Bindung erfolgte mit einem α -HA-PE-Konjugat. Anschließend wurden die Proben in Hinsicht auf die CD303L-Färbung am MACSQuant *Analyzer* analysiert.

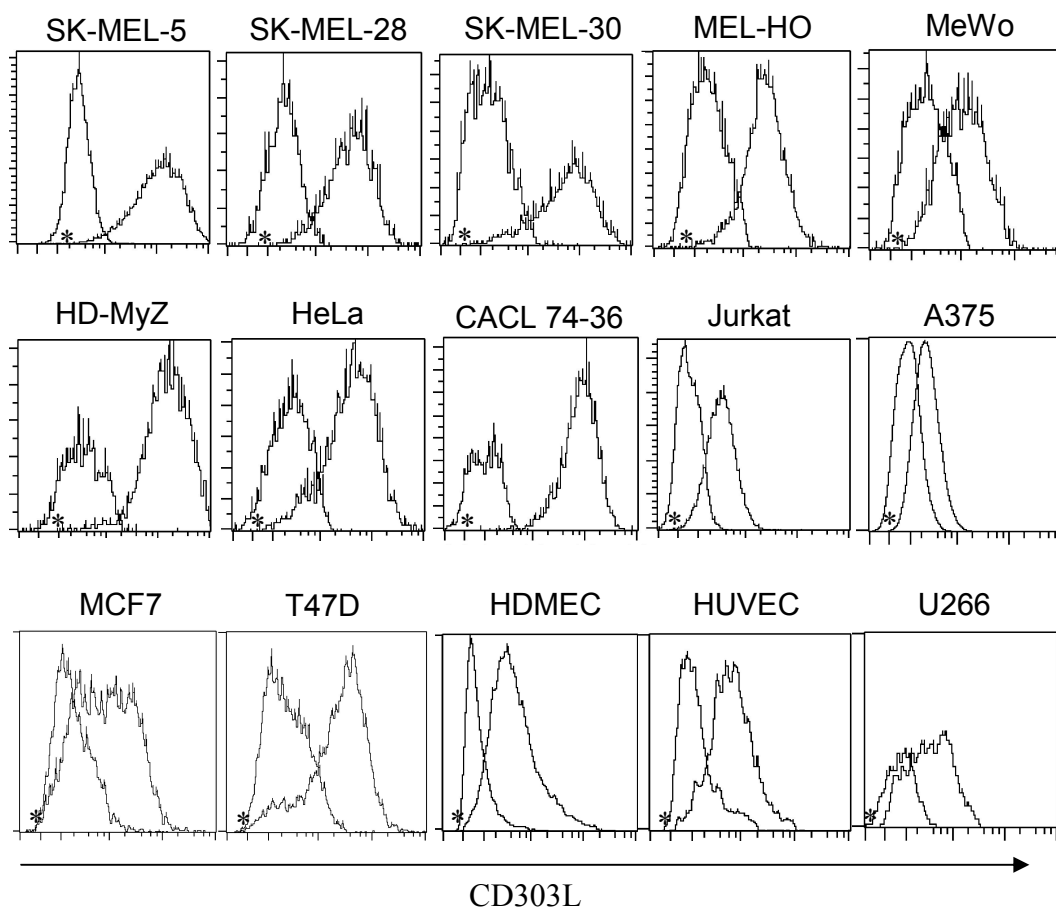
Für die rCD303-CD303L Interaktion konnte neben einer Ca^{2+} -Abhängigkeit auch eine Salz-Sensitivität aufgrund ionischer Wechselwirkungen gezeigt werden. Mit zunehmender Salzkonzentration nahm die Färbintensität des CD303L auf SK-MEL-5-Zellen ab (Kolbe, 2010). Auch diese Tatsache wurde für weitere experimentelle Schritte berücksichtigt.

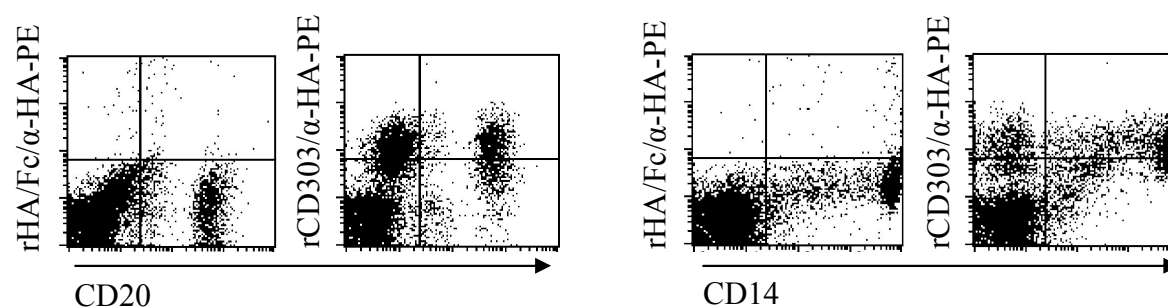
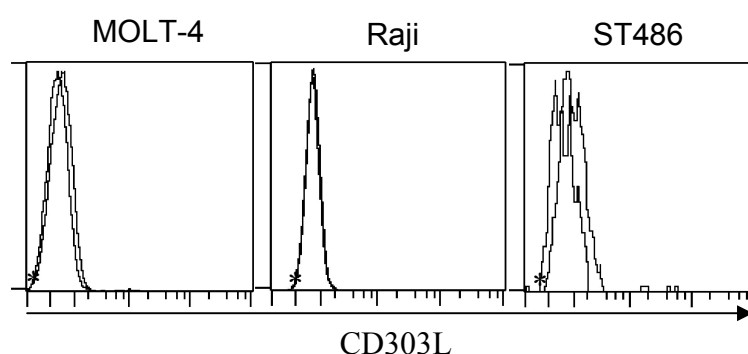
3.3 Definition von CD303L^+ und CD303L^- Zelllinien

Das Ziel dieser Arbeit war es den natürlichen Liganden von CD303, der bisher unbekannt war, zu isolieren. Nachdem das rCD303-Protein funktionell charakterisiert wurde und gezeigt werden konnte, dass die CD303L-Bindung Ca^{2+} -abhängig ist, wurde ein großer Zelllinien-screen im HBSS-Puffer durchgeführt. Für viele Lektine wurde beschrieben, dass sie Liganden extrazellulär auf Krebszellen binden (Clark und Mao, 2012). So konnte die Melanomzelllinie SK-MEL-5 als eine CD303L^+ Zelllinie definiert werden. Weitere CD303L^+ Krebszelllinien, aber auch normale immortalisierte Zelllinien, wurden im Zuge des Screens identifiziert und sind in Abb. 15A dargestellt: SK-MEL-28, SK-MEL-30, MEL-HO, MeWo, HD-MyZ, HeLa, CACL 74-36, Jurkat, A375, MCF7, T47D, HDMEC, HUVEC und U266. Zusätzlich konnten

TE671-, HEK-, CHO- und Daudi-Zellen als CD303L⁺ beschrieben werden (Kolbe, 2010). Aber nicht nur Zelllinien, sondern auch bestimmte Primärzellen aus dem peripheren Blut (PBMC) konnten als CD303L⁺ definiert werden. So konnte eine rCD303-Bindung auf B-Zellen (CD20⁺) und Monozyten (CD14⁺) nachgewiesen werden (Abb. 15B). Untersuchungen von B-Zellen aus humanen Rachenmandeln haben gezeigt, dass sich bestimmte B-Zell-Subpopulationen definieren lassen, die den CD303L exprimieren. Es handelte sich dabei um naive B-Zellen, Gedächtnis-B-Zellen und Plasmazellen. B-Zellen aus Keimzentren blieben CD303L⁻ (Kolbe, 2010). Auf isolierten T-Zellen, NK-Zellen und PDCs aus PBMC konnte kein CD303L-Nachweis erbracht werden (Daten nicht gezeigt). Neben CD303L⁺ Zelllinien konnten eine Reihe von humanen und nicht-humanen Krebszelllinien wie MOLT-4, Raji, ST486 (Abb. 15C), U937 und RBL-1 (Daten nicht gezeigt) definiert werden, die keinen CD303L exprimierten.

(A) CD303L⁺ Zelllinien



(B) CD303L⁺ Primärzellen(C) CD303L⁻ Zelllinien**Abbildung 15. Identifikation von CD303L⁺ und CD303L⁻ Zellen**

(A) SK-MEL-5, SK-MEL-28, SK-MEL-30, MEL-HO, MeWo, HD-MyZ, HeLa, CACL 74-36, Jurkat, A375, MCF7, T47D, HDMEC, HUVEC und U266 wurden zuerst mit 2,5 µg/ml rCD303 und anschließend mit α-HA-PE in HBSS-Puffer für 10 min zum extrazellulären Nachweis von CD303L inkubiert. Als negative Kontrolle (*) diente das Kontrollprotein rHA/Fc bzw. die Isotypkontrolle α-HA-PE. Die Aufnahme erfolgte am MACSQuant Analyzer.

(B) Periphere mononukleäre Zellen wurden aus *Buffy coats* aufgearbeitet und wie in A beschrieben gefärbt. Zur Gegenfärbung wurden Konjugate gegen CD20 zum Nachweis von B-Zellen und CD14 zum Nachweis von Monozyten eingesetzt.

(C) MOLT-4-, Raji- und ST486-Zellen wurden wie in A beschrieben gefärbt und am Durchflusszytometer aufgenommen.

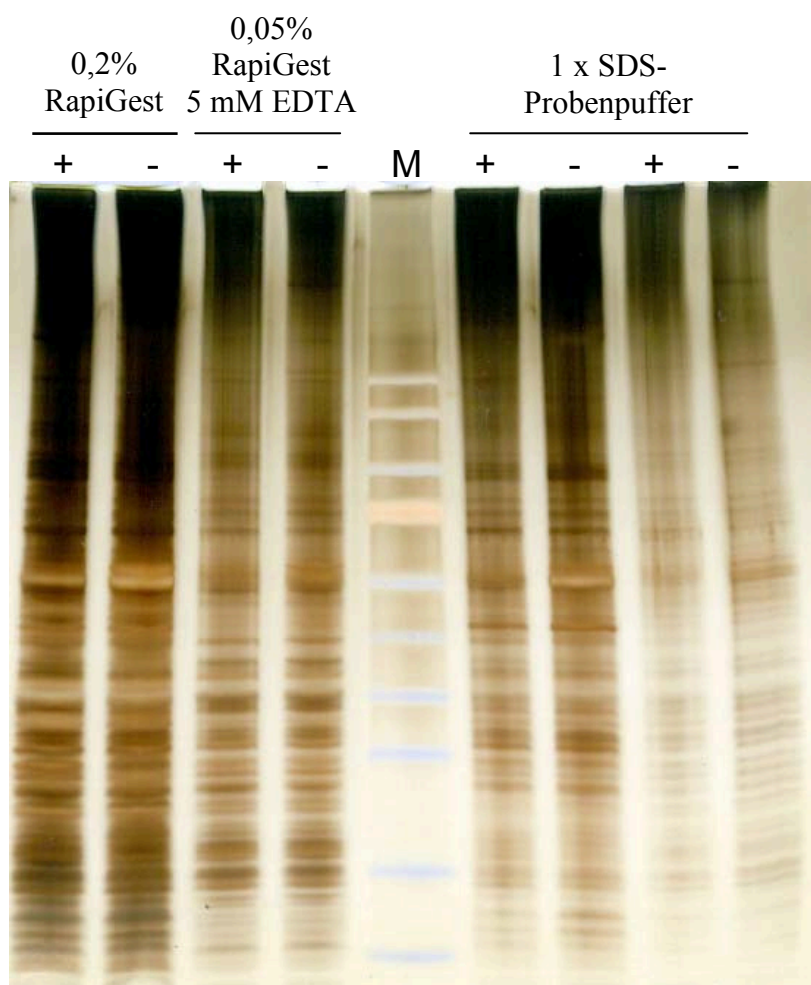
Aufgrund dieser Daten lässt sich schlussfolgern, dass CD303L sehr heterogen auf verschiedenen Zellen exprimiert wird. Es stellte sich die Frage, ob es sich dabei um einen oder verschiedene Interaktionspartner von CD303 handelt. Um diese Frage zu klären und den CD303L zu isolieren und zu identifizieren, wurden unterschiedliche Immunpräzipitationsansätze, die im folgenden Kapitel näher beschrieben werden, durchgeführt.

3.4 Immunpräzipitation

Immunpräzipitationen (IP) werden sehr häufig eingesetzt, um Protein-Protein-Wechselwirkungen nachzuweisen und unbekannte Interaktionspartner zu isolieren (Monti *et al.*, 2009). In der Regel wird ein Köderprotein an ein festes Substrat oder eine Matrix gekoppelt. Spezifische Antigene, die aufgrund einer hohen Affinität an das Köderprotein binden, können anschließend aus einem inhomogenen Gemisch präzipitiert und mit Hilfe der Massenspektrometrie (MS) identifiziert werden. Dieses Prinzip diente nun im Folgenden als Basis für die Isolation des CD303L mit Hilfe von rCD303, welches als Köderprotein eingesetzt wurde. Wie in Kapitel 3.3 beschrieben wurde, konnten einige Zelllinien identifiziert werden, die den CD303L auf der Zelloberfläche exprimieren, da dieser durchflusszytometrisch mit rCD303 extrazellulär nachgewiesen werden konnte. Somit fiel das Interesse zuerst auf Membranproteine, die als CD303L in Frage kamen, um die Komplexität der Ausgangsfraction zu minimieren.

3.4.1 Direkt gekoppelte rCD303-MicroBeads

Im ersten Ansatz wurden 50 nm große Magnetpartikel (MicroBeads) direkt kovalent an rCD303 gekoppelt. Membranproteine der CD303L⁺ Melanomzelllinie SK-MEL-5 wurden solubilisiert und über Nacht mit rCD303-MicroBeads (rCD303-MB) bzw. leeren, deaktivierten und inerten MicroBeads als Negativkontrolle inkubiert. Anschließend wurden die interagierenden Proteine über ein magnetisches Feld angereichert und mit 0,2% RapiGest bzw. einer Kombination aus 0,05% RapiGest und 5 mM EDTA eluiert. RapiGest ist ein Surfactant, das Proteine (inkl. Glykoproteine) solubilisiert und enzymatische Spaltungen für die nachfolgende MS-Analyse verstärkt. Da die CD303-CD303L Interaktion, wie zuvor beschrieben, Ca²⁺-abhängig ist, wurde der Chelator EDTA, welches Ca²⁺ komplexiert, alternativ zur Elution der interagierenden Proteine verwendet. Um zu prüfen, wie viele Proteine nach dieser Elution weiterhin an der μ MACS-Säule gebunden waren, folgte ein weiterer Elutionsschritt mit heißem 1xSDS-Probenpuffer. Eluierte Proteine wurden auf einem SDS-Gel der Größe nach elektrophoretisch aufgetrennt und mit Hilfe einer Silberfärbung sichtbar gemacht. Abb. 16 zeigt, dass sehr viele Proteine unspezifisch an MicroBeads gebunden wurden. Zwischen der Elutionsfraction mit rCD303-MB und der mit leeren MB lässt sich aufgrund des starken Hintergrundes kein Unterschied im Bandenmuster unabhängig von der Elutionsmethode feststellen. Auch beim näheren Betrachten akkumuliert keine Bande in der positiven rCD303-MB Probe. Weiterhin zeigt sich, dass eine wiederholte Elution mit heißem 1xSDS-Probenpuffer noch viele weitere Proteine von der μ -Säule lösen kann.



+ rCD303-MicroBeads
- deaktivierte MicroBeads

Abbildung 16. Immunpräzipitation mit direkt gekoppelten rCD303-MB

4×10^8 SK-MEL-5-Zellen wurden im hypotonischen Lysepuffer lysiert. Membranproteine wurden mit Hilfe der Ultrazentrifugation angereichert und im nativen Lysepuffer solubilisiert. Jeweils die Hälfte der Probe wurde mit rCD303-MB (+) bzw. mit leeren MB (-) über Nacht bei 4°C inkubiert. Anschließend wurden die Ansätze nochmal geteilt und über μ MACS-Säulen magnetisch aufgereinigt. Die Elution erfolgte entweder mit 0,2% RapiGest bzw. 0,05% RapiGest und 5 mM EDTA. Anschließend wurde eine weitere Elution der 4 μ MACS-Säulen mit heißem 1xSDS-Probenpuffer durchgeführt. Die entsprechenden Fraktionen wurden auf ein 10-20%iges Tris-Glycin-Gel aufgetragen und elektrophoretisch größenmäßig aufgetrennt. Das Gel wurde danach einer Silberfärbung unterzogen.

Für eine genaue molekulare Analyse wurden die Proben zur Arbeitsgruppe von Dr. B. Wollscheid der ETH Zürich versandt. In einer Kooperation analysierte A. Frei die genaue Proteinzusammensetzung in den jeweiligen Eluatfraktionen, um mögliche CD303L-Kandidaten vorhersagen zu können. Mit dem Programm Cytoscape konnten die identifizierten

Proteine dargestellt und jeweiligen Elutionsmethoden zugeordnet und miteinander verknüpft werden (Abb. 17).

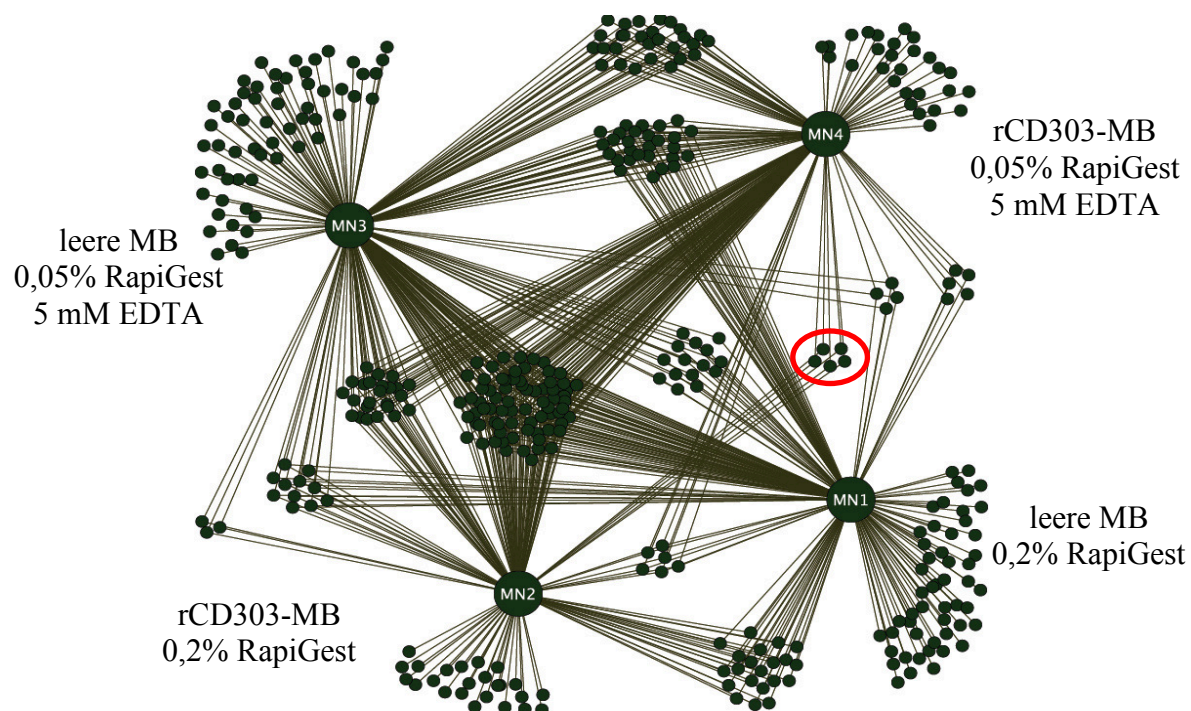


Abbildung 17. Cytoscape-Darstellung der identifizierten Proteine nach einer IP mit rCD303-MB

Identifizierte Proteine wurden mit Hilfe des öffentlich zugänglichen bioinformatischen Cytoscape-Programms in einem Netzwerk abgebildet. Als CD303L können primär die Kandidaten vorgeschlagen werden, die in beiden positiven Proben mit rCD303-MB angereichert werden konnten (Kreis).

MS-Analysen bestätigten die Ergebnisse der Silberfärbung. Insgesamt konnte eine hohe Anzahl an Proteinen in jeder Elutionsfraktion identifiziert werden. Ausgehend von den Schnittstellen der Eluatfraktionen im Cytoscape-Diagramm (Abb. 17), waren einige Proteine in mehreren Eluatfraktionen enthalten, was die unspezifische Bindung dieser Proteine an die MicroBeads zeigt. Als CD303L-Kandidaten konnten Proteine vorgeschlagen werden, die sowohl mit 0,2% RapiGest als auch mit 0,05% RapiGest und 5 mM EDTA eluiert wurden. Es konnten folglich 5 Proteine identifiziert werden (Abb. 17, Kreis). Es handelte sich dabei um 4 ribosomale Proteine und 1 konserviertes hypothetisches Protein mit unbekannter Funktion. Diese Proteine waren sehr wahrscheinlich Kontaminationen der Membranpräparation und können somit als CD303L ausgeschlossen werden. Betrachtet man die Proteine, die unabhängig von der jeweiligen Elutionsmethode eluiert wurden, so konnten auch hier keine CD303L-Kandidaten vorgeschlagen werden. Dieser Ansatz führte demzufolge zu keinem Erfolg.

3.4.2 Protein A-Sepharose und direkt gekoppelte rCD303-Sepharose

Der Einsatz von MB als Matrix für die Kopplung von rCD303 führte zu einem hohen Hintergrund aufgrund unspezifischer Bindungen. Um diesen Effekt zu minimieren, wurde eine andere Trägersubstanz in Form von Sepharose gewählt. Dabei wurden zwei Ansätze miteinander verglichen. Zum einen wurde eine indirekte IP mit Protein A-Sepharose, bei der rCD303 über den humanen Fc-Tag an Protein A gebunden wurde, durchgeführt. Zum anderen wurde direkt gekoppelte rCD303-Sepharose, bei der rCD303 über primäre Amine kovalent an Cyanbromid (CNBr)-aktivierte Sepharose verknüpft wurde, für die IP eingesetzt. Als negative Kontrolle für unspezifische Bindungen der HA und Fc-Tags wurde das Kontrollprotein rHA/Fc verwendet. Darüber hinaus wurde die Effektivität eines *Preclear*-Schrittes getestet. Proteine, die unspezifisch an Sepharose binden, sollten dadurch abgereichert werden. Nach dem *Preclear* wurde die verbleibende Membranfraktion der SK-MEL-5-Zellen mit rCD303-Protein A-Sepharose inkubiert. Nach der IP wurde die verwendete Sepharose gewaschen und im Falle der indirekten IP in 1xSDS-Probenpuffer aufgekocht bzw. im Falle der direkten IP mit 0,2% RapiGest inkubiert, um interagierende Proteine von der Matrix zu lösen. Die Eluate wurden anschließend auf einem SDS-Gel mit Hilfe der Silberfärbung analysiert (Abb. 18).

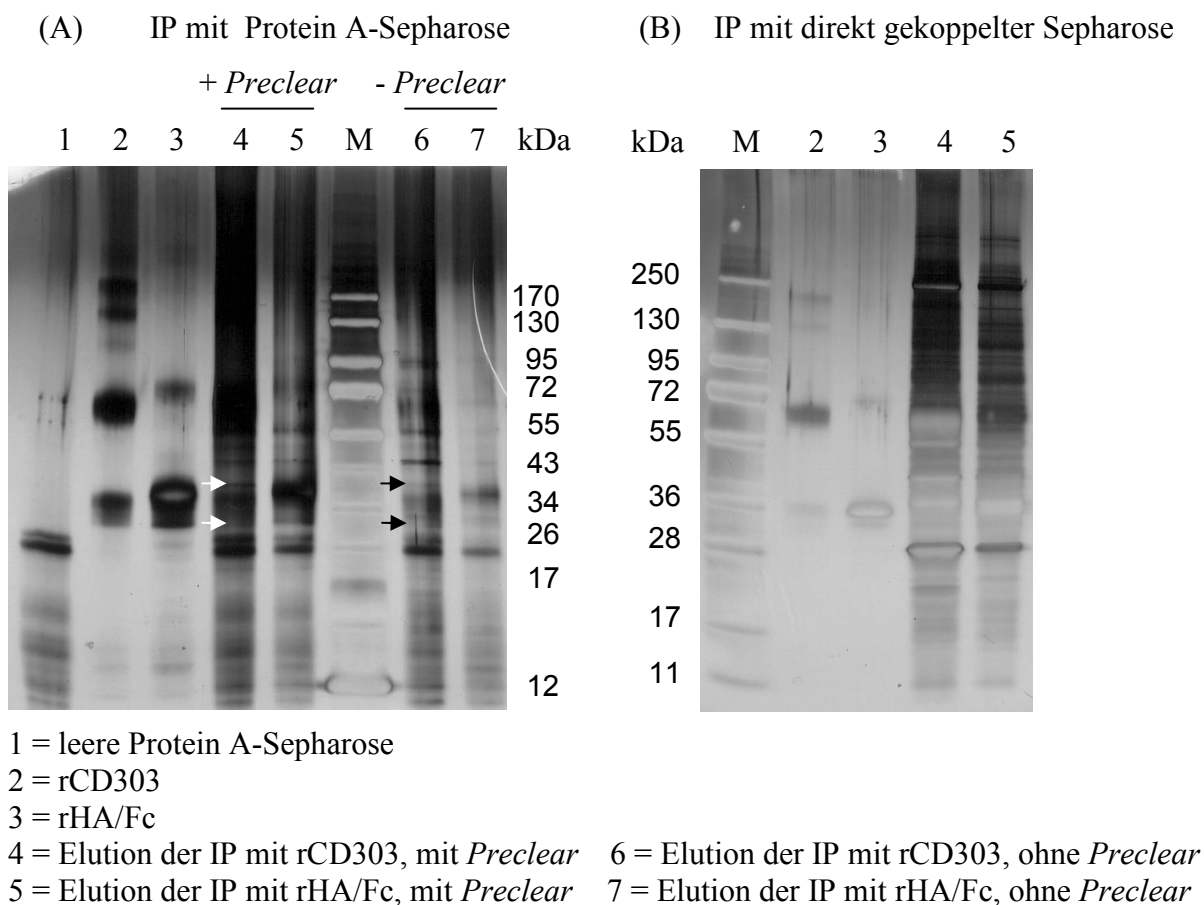


Abbildung 18. Immunpräzipitation mit Sepharose als Matrix

Membranproteine aus jeweils 10^8 SK-MEL-5-Zellen wurden nach einer hypotonischen Lyse mit Hilfe der Ultrazentrifugation isoliert und im nativen Lysepuffer solubilisiert.

(A) Leere Protein A-Sepharose wurde zuerst über Nacht bei 4°C mit einem Teil der Membranfraktion inkubiert, um unspezifisch bindende Proteine abzureichern (+ *Preclear*). rCD303 bzw. rHA/Fc wurde anschließend über den Fc-Tag an Protein A-Sepharose und mit dem Überstand des *Preclears* für 2 h bei 4°C inkubiert. Alternativ wurde kein *Preclear* durchgeführt (- *Preclear*). Die Ansätze wurden 4 mal mit IP-Puffer gewaschen und die Sepharose danach mit 1xSDS-Probenpuffer aufgeköcht. Die eluierten Proteine wurden auf einem 10-20%igen Tris-Glycin Gel aufgetrennt und mit Silberfärbung visualisiert.

(B) rCD303 bzw. rHA/Fc wurden über primäre Amine an Cyanbromid-aktivierte Sepharose kovalent gekoppelt. Diese wurde mit der Membranfraktion nach einem *Preclear* für 2 h bei 4°C inkubiert, mit IP-Puffer gewaschen und anschließend mit 0,2% RapiGest eluiert. Ein Aliquot wurde auf das Gel, welches mit Silber gefärbt wurde, aufgetragen. Der Rest wurde massenspektrometrisch untersucht.

Zu Kontrollzwecken wurde leere Sepharose, 0,5 µg (indirekte IP) bzw. 0,4 µg (direkte IP) des rCD303 bzw. rHA/Fc Proteins auf das Gel aufgetragen.

Die Verwendung von Sepharose führte zu einer geringen Reduzierung des unspezifischen Hintergrundes verglichen mit der IP mit MB (Abb. 16 + 18). Allerdings zeigte der *Preclear* keinen positiven Effekt auf die Abreicherung weiterer unspezifischer Wechselwirkungen. Weiterhin konnten sowohl rCD303 als auch rHA/Fc in den jeweiligen Eluatfraktionen angereichert werden, obwohl dies vor allem im Ansatz mit direkt gekoppelter Sepharose durch die kovalente Bindung der rekombinanten Proteine an CNBr-Sepharose eigentlich nicht zu erwarten wäre. Neben der UZ, die für die Präparation der Membranproteine eingesetzt wurde, wurden weitere Membranpräparationsmethoden (Extraktionskit und totale Zelllyse) in der IP miteinander verglichen. Es konnte jedoch kein Unterschied im Bandenmuster zur in Abb. 18 dargestellten UZ-Methode festgestellt werden (Daten nicht gezeigt). Beim Vergleich der Eluate der indirekten IP lassen sich zwei Proteinbanden detektieren, die nur in der positiven (rCD303-Protein A-Sepharose) und nicht in der negativen Fraktion (rHA/Fc-Protein A-Sepharose) vorhanden sind. Die obere Bande läuft bei ca. 38 kDa und die untere bei etwa 30 kDa (Abb. 18A, weiße und schwarze Pfeile). Um diese Proteine zu identifizieren, wurden die Proteinbanden ausgeschnitten und zur Peptid-Massen-Fingerprint (PMF)-Analyse zum Zentrum für Molekulare Medizin Köln (ZMMK) versandt. Die PMF-Analyse ergab, dass sich beide Proteinbanden aus einem Gemisch von Proteinen zusammensetzten. Neben einigen Verunreinigungen wie Keratinen und Rinder Serum Albumin, wurde die obere Bande als Glyceraldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH, G3P) identifiziert (Tabelle 1). Das Molekulargewicht von GAPDH (36 kDa) stimmte mit der ausgeschnittenen Bandengröße von

ca. 38 kDa überein und bekräftigte dadurch die GAPDH-Identität der Proteinbande. Die untere Bande wurde mit einer hohen Wahrscheinlichkeit als ein Rinderprotein (ADT3 bzw. ADT1) identifiziert (Tabelle 2). In beiden Proben konnte außerdem das rCD303-Protein detektiert werden, was man theoretisch erwarten könnte, da es als Köderprotein zur Präzipitation von Interaktionspartnern in der IP eingesetzt wurde.

Tabelle 1. PMF-Analyse der oberen Proteinbande (~ 38 kDa)

Die Proteinbande, die in Abb. 18 mit einem Pfeil markiert wurde und bei ca. 38 kDa läuft, wurde aus dem Gel ausgeschnitten und mittels Peptid-Massen-Fingerprint (PMF) am Zentrum für Molekulare Medizin Köln (ZMMK) analysiert. Proteinhits zur Identifikation des Proteins sind mit der jeweiligen Beschreibung, der molekularen Masse und der statistischen Signifikanz eines PMF-Treffers (*Score*) dargestellt.

Proteinhits	Beschreibung	Masse in kDa	Score
Albu Rind	Serum Album	71244	388
K1C9 Mensch	Keratin, Typ I Zytoskelett 9	62320	164
rCD303		54192	137
G3P Mensch	Glyceraldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase	36201	113
IGHG1 Mensch	Ig gamma-1 Kette C Region	36596	94
K22E Mensch	Keratin, epidermales Typ II Zytoskelett	66110	85

Tabelle 2. PMF-Analyse der unteren Proteinbande (~ 30 kDa)

Die Proteinbande, die im Gel der Abb. 18 bei ca. 30 kDa läuft, wurde wie in Tabelle 1 beschrieben, analysiert.

Protein Hits	Beschreibung	Masse in kDa	Score
ADT3 Rind	ADT/ATP Translokase 3	33084	66
ADT1 Rind	ADT/ATP Translokase 1	33174	60
IGHG Kaninchen	Ig gamma Kette C Region	35952	39
rCD303		54192	39

Zur Untersuchung der RapiGest-Elutionsfraktionen der IP mit direkt gekoppelter rCD303 bzw. rHA/Fc-Sepharose wurden die Proben für MS-Analysen nach Zürich verschickt.

Es konnte eine geringe Anzahl an Proteinen, die mit rCD303-Sepharose präzipitiert wurden, identifiziert werden. Im Unterschied dazu wurden mehr Proteine in der negativen rHA/Fc-Kontrolle identifiziert, was auf einen hohen unspezifischen Hintergrund schließen lässt. Im Allgemeinen konnten wenige Membranproteine, jedoch viele intrazelluläre und kontaminierende Proteine wie Keratine detektiert werden. Dies deutet auf eine unzureichende Membran-

präparation hin. Zusätzlich konnte neben rCD303, welches überzeugend mit sehr vielen Peptiden identifiziert wurde, auch wieder GAPDH mit rCD303-Sepharose präzipitiert werden (Tabelle 3).

Tabelle 3. Kandidaten, die mit direkt gekoppelter rCD303-Sepharose präzipitiert werden konnten

Die Membranfraktion von SK-MEL-5-Zellen wurde mit direkt gekoppelter rCD303- bzw. rHA/Fc-Sepharose inkubiert und interagierende Proteine wurden mit 0,2% RapiGest eluiert. Die Eluatfraktionen wurden von A. Frei aus der Arbeitsgruppe von Dr. B. Wollscheid (ETH Zürich) massenspektrometrisch analysiert. Proteine, die mit rCD303-Sepharose angereichert werden konnten, sind dargestellt. PM = Plasmamembran, ER = Endoplasmatisches Retikulum

Lokalisation	Kandidaten in der rCD303-Eluatfraktion	Peptide
Zytoplasma/PM	Glyceraldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase	4
Mitochondrium	Einzelstrang DNA-bindendes Protein, mitochondrialer Vorläufer	3
Zytoplasma	Galectin-1	8
Membran	Anti-colorectal Carcinoma, schwere Kette	3
Zytoplasma	Isoform 1 von L-Laktat Dehydrogenase A Kette	3
Zytoplasma	Isoform 1 von Myosin-Va	N/A
Membran	Isoform 1 von CD303	53
Zytoplasma	Isoform 1 von 60S ribosomales Protein L11	N/A
Zytoplasma	Isoform 2 von Protein Disulfid-Isomerase A6, Vorläufer	6
Zellkern	Verlängerungsfaktor 1-alpha 2	6
ER	Endoplasmin Vorläufer	4
unbekannt	19 kDa Protein	6

Da GAPDH in zwei unabhängigen Methoden mittels rCD303 präzipitiert werden konnte, wurde das Protein genauer untersucht. GAPDH ist für jedes Lebewesen essentiell, da es wichtige Funktionen in der Glykolyse erfüllt und somit als *housekeeping*-Gen bekannt ist. Aufgrund dieser Eigenschaft würde man für das Protein eine ausschließlich intrazelluläre Lokalisation erwarten. Allerdings gibt es Hinweise, dass GAPDH auch andere Funktionen erfüllen kann. So beschreiben Raje und Kollegen, dass GAPDH je nach Eisenverfügbarkeit als Transferrin-Rezeptor auf der Zelloberfläche von humanen und murinen Makrophagen fungieren kann (Raje *et al.*, 2007; Kumar *et al.*, 2012). Weiterhin wird GAPDH als Biomarker für Brustkrebs vorgeschlagen, da es mit der Na⁺/K⁺-ATPase auf der Zelloberfläche von humanen Brustkrebs-Zelllinien kolokalisiert (Correa *et al.*, 2010). GAPDH weist somit je nach Funktion unterschiedliche subzelluläre Lokalisationen auf und unterstützt dadurch die Annahme, ein Kandidat des CD303L zu sein. Ein weiteres Kriterium, GAPDH näher als CD303L zu analysieren, beruhte auf der Tatsache, dass für einige Liganden eine genetische Verknüpfung zu ihren Rezeptoren aufgrund enger räumlicher Distanz auf demselben Chromo-

som beschrieben wurde (Hurst und Lercher, 2005). Eine Untersuchung der chromosomalen Lokalisation von CD303 und GAPDH ergab, dass auch hier gleicher genomischer Kontext gefunden werden konnte. Beide Gene sind auf dem Chromosom 12 in unmittelbarer Nähe zueinander lokalisiert: CD303 (CLEC4C) – Arm 12p13.2-p12.3 und GAPDH – Arm 12p13.31. Infolgedessen wurden Validierungsstudien durchgeführt, um zu überprüfen, ob GAPDH wirklich ein Ligand von CD303 ist. Sowohl eine CD303L⁺ (SK-MEL-5) als auch eine CD303L⁻ (Raji) Zelllinie wurde verwendet, um eine Gegenfärbung von GAPDH und rCD303 durchzuführen. Falls GAPDH ein Ligand von CD303 wäre, würde man ein identisches Färbemuster auf der Zelloberfläche der getesteten Zelllinien erwarten. Dies ist jedoch nicht der Fall, wie man anhand Abb. 19 erkennen kann. GAPDH konnte nicht auf der Zelloberfläche von SK-MEL-5-Zellen nachgewiesen werden. Ebenso konnte die rCD303-Färbung mit Hilfe eines polyklonalen GAPDH-Antikörpers, der im Überschuss zum Färbeansatz dazu gegeben wurde, nicht geblockt werden (Abb. 20). Aufgrund dieser Daten konnte GAPDH nicht als CD303L bestätigt werden.

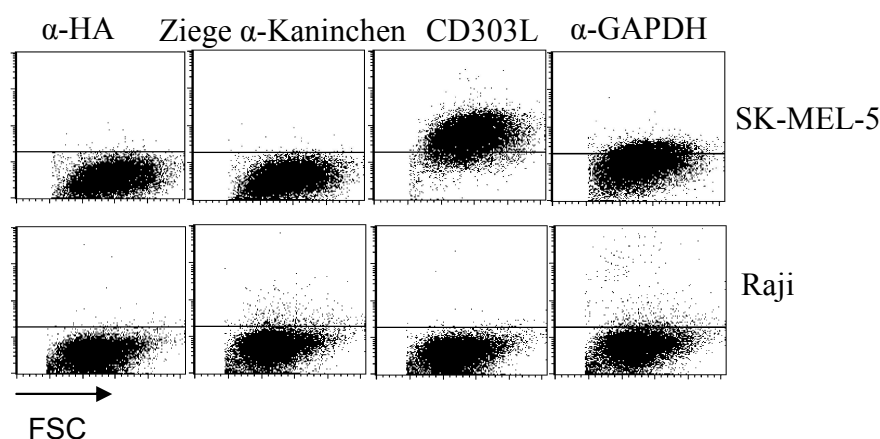


Abbildung 19. GAPDH- und CD303L-Nachweis auf der Zelloberfläche von SK-MEL-5- und Raji-Zellen

SK-MEL-5- und Raji-Zellen wurden standardmäßig mit 1 µg/ml rCD303 in HBSS-Puffer gefärbt. Die Detektion dieser Bindung erfolgte mit einem α-HA-Konjugat (→ CD303L). Der Nachweis von GAPDH wurde mit einem Kaninchen α-Mensch GAPDH-Antikörper (1:50) in Kombination mit einem Ziege α-Kaninchen-Sekundärantikörper (1:20) erbracht. Als Negativkontrolle wurde sowohl das α-HA als auch das Ziege α-Kaninchen-Konjugat eingesetzt.

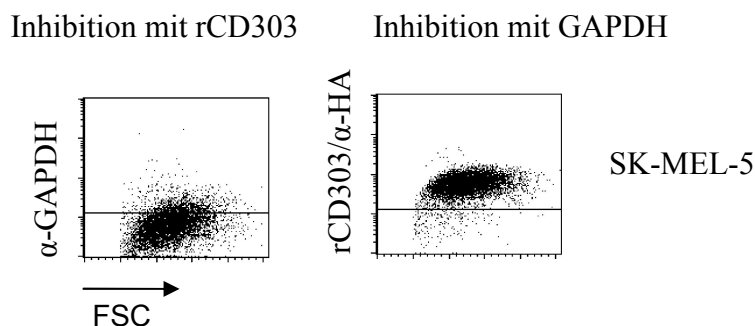


Abbildung 20. Inhibition der GAPDH- bzw. CD303L-Färbung

SK-MEL-5-Zellen wurden mit 100 µg/ml des rCD303-Proteins bzw. 6 mg/ml des GAPDH Proteins für 10 min bei 4°C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen gewaschen und zum Nachweis von GAPDH oder des CD303L entsprechend Abb. 19 gefärbt. Die Aufnahmen erfolgten am MACSQuant Analyzer.

Da die durchgeführten Immunpräzipitationen nicht zur Isolation des CD303-Liganden geführt haben, wurde eine neue Methode, die von A. Frei aus der Arbeitsgruppe von Dr. B. Wollscheid (ETH Zürich) im Rahmen seiner Doktorarbeit etabliert wurde, in Kooperation getestet.

3.5 Ligand-based Receptor Capturing (LRC)

Die Arbeitsgruppe von Dr. B. Wollscheid der ETH Zürich entwickelte die *Cell Surface Capturing* (CSC)-Technologie, mit der das N-Glykoproteom auf Zelloberflächen mit Hilfe der Massenspektrometrie (MS) identifiziert und quantifiziert werden kann (Wollscheid *et al.*, 2009). Aufbauend auf dieser Grundlage etablierte A. Frei eine Methode, die als *Ligand-based Receptor Capturing* (LRC) bezeichnet wurde (Frei *et al.*, 2012). Mit diesem System lassen sich Liganden über eine Rezeptor-vermittelte Bindung mit Hilfe von chemischen trifunktionellen Reagenzien (TRICEPS) zuerst vernetzen und anschließend spezifisch und sensitiv mittels MS identifizieren. Die Spezifität dieser Methode wurde anhand von Insulin demonstriert, bei der Insulinrezeptor mit einer sehr hohen Effizienz angereichert werden konnte (Frei *et al.*, 2012). Basierend auf diesen Daten sollte der CD303L mittels LRC isoliert und identifiziert werden. CD303L⁺ Jurkat-Zellen wurden zusammen mit dem rekombinanten Protein rCD303 oder der negativen Kontrolle rHA/Fc bzw. der positiven Kontrolle Insulin für die Analyse eingesetzt. Die Ergebnisse aus zwei unabhängigen LRC-Experimenten sind in Abb. 21 und Abb. 22 dargestellt. Der Insulinrezeptor (INSR) konnte mit einem Faktor von ca. 16 mittels Insulin angereichert werden, wodurch vorherige Untersuchungen bestätigt wurden.

Der Einsatz von rCD303 führte zu einer signifikanten Anreicherung von CD222 (Mannose-6 Phosphat-Rezeptor = MPRI oder *Insulin-like Growth Factor 2 Receptor* = IGF2R) mit einem Faktor von ca. 6. Weiterhin konnten die CD303-Domäne und die Fc-Domäne des IgG1-Moleküls, welche an CD303 fusioniert wurde, mit 5 bzw. 2 Peptiden in der rCD303-Probe angereichert werden (Abb. 21).

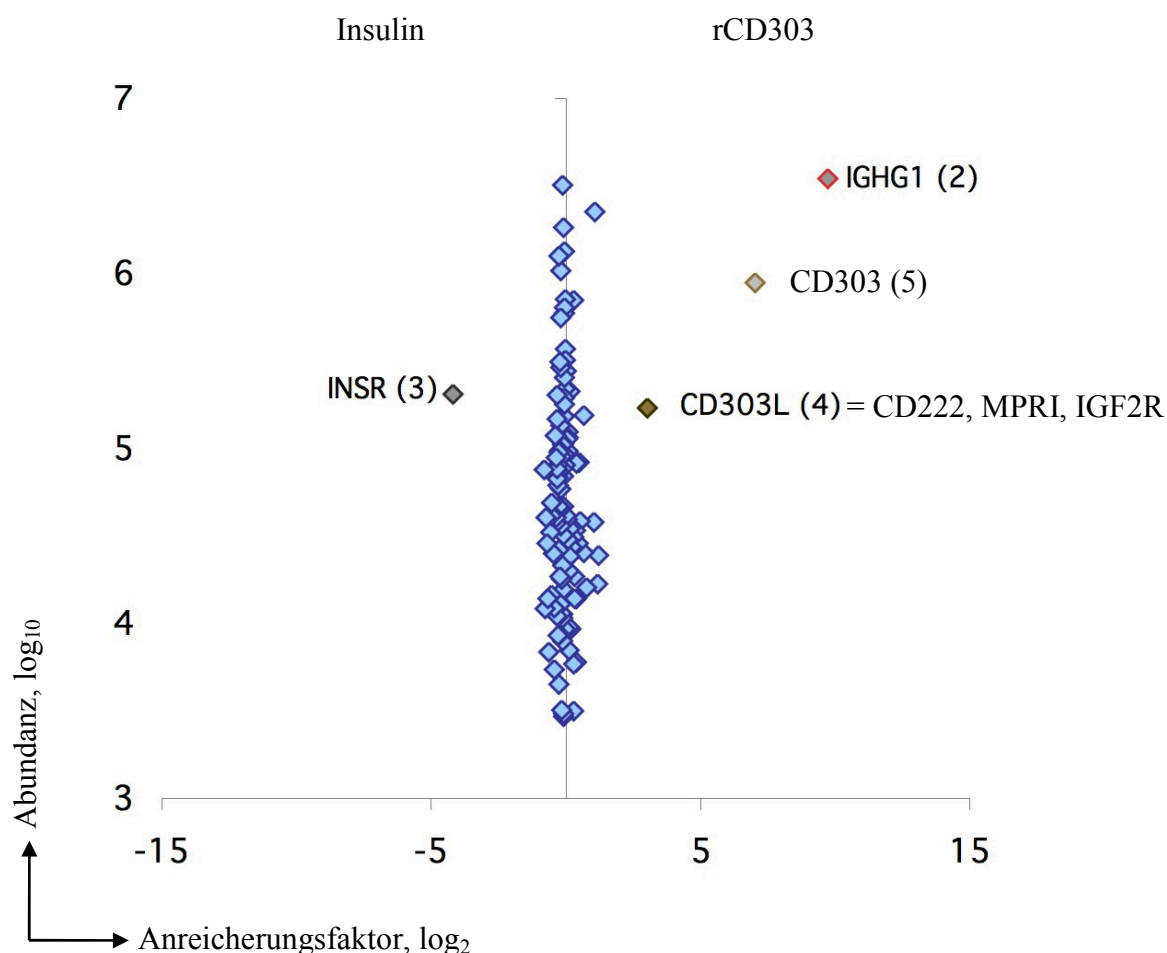


Abbildung 21. CD222 kann spezifisch mit rCD303 durch LRC isoliert werden

Insulin bzw. rCD303 wurden an einen trifunktionellen *Crosslinker* gekoppelt und anschließend in separaten Ansätzen mit Jurkat-Zellen, die zuvor oxidiert wurden, inkubiert, wodurch eine Quervernetzung des Liganden mit dem Rezeptor erreicht wurde. Die Zellen wurden homogenisiert und tryptisch verdaut. Anschließend wurden die quervernetzten Peptide über Affinitätschromatographie aufgereinigt und die Zucker von N-glykosidischen Verknüpfungen gespalten. Die Glykopeptide wurden mittels MS identifiziert. Proteine, die mit Insulin angereichert wurden, sind links neben der y-Achse und Proteine, die mit rCD303 angereichert wurden, rechts neben der y-Achse in Abhängigkeit vom Anreicherungsfaktor abgebildet. Dieser wurde zur besseren Darstellung 2-fach logarithmiert. Die Abundanz der Proteine innerhalb eines Gemisches ist auf der y-Achse im Logarithmus zur Basis 10 dargestellt. Die Anzahl der identifizierten Peptide ist in Klammern angegeben. Es wurden 3 biologische Replikate von A. Frei an der ETH Zürich durchgeführt. INSR = Insulinrezeptor.

In einem alternativen Ansatz, bei dem rHA/Fc als negative Kontrolle eingesetzt wurde, konnte CD222 mit einem Anreicherungsfaktor von ca. 4 als CD303L verifiziert werden (Abb. 22). Die Spezifität der Methode wird hier anhand der Fc-Domäne des IgG1-Moleküls demonstriert, da die identifizierten Peptide nun, wie erwartet, nicht in einer der Proben akkumulieren.

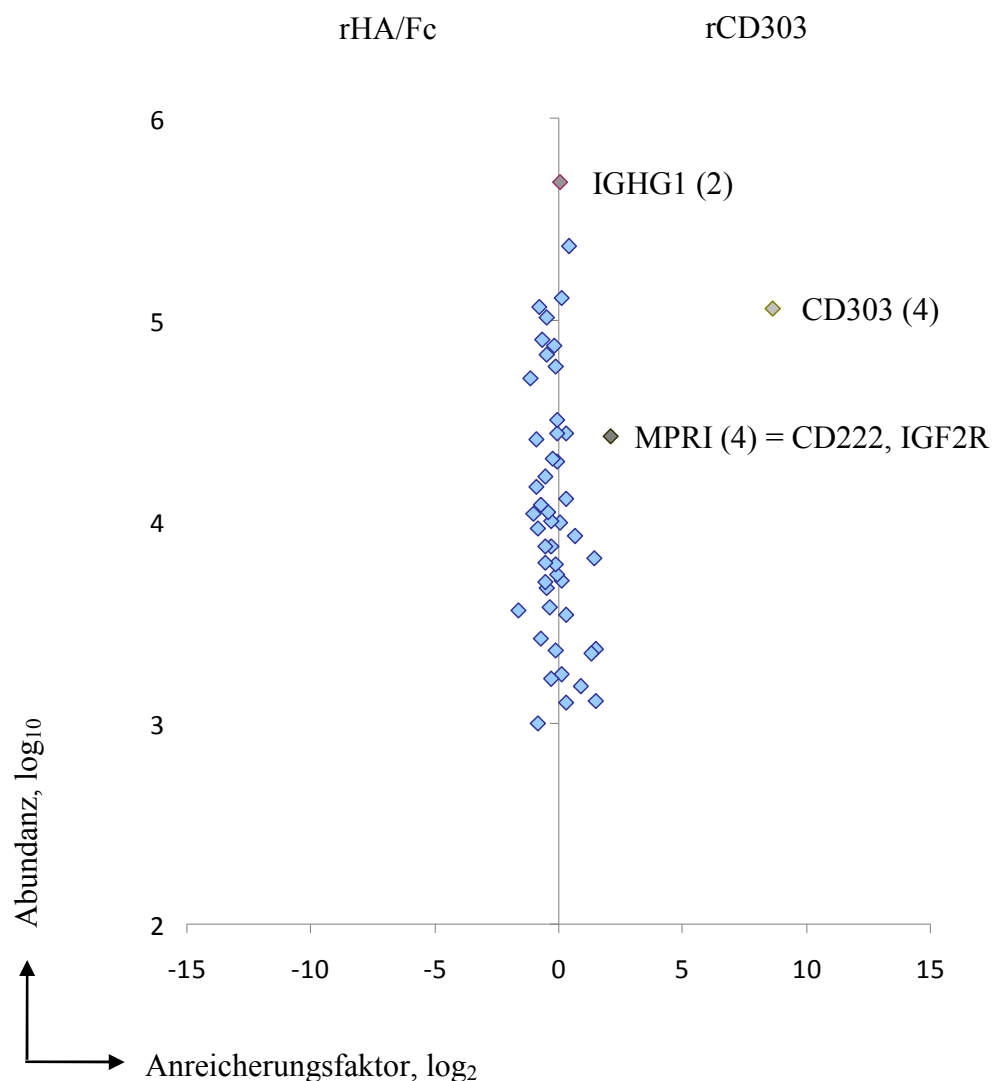


Abbildung 22. CD222 kann als CD303L vorgeschlagen werden

Anstelle von Insulin wurde rHA/Fc für LRC eingesetzt. Die Durchführung und die Darstellungserläuterung sind der Abb. 21 zu entnehmen. Die Analyse wurde von A. Frei an der ETH Zürich durchgeführt.

3.5.1 Validierungsuntersuchungen: CD222 ein Ligand von CD303?

CD222 übernimmt wichtige Funktionen im intrazellulären Transport von phosphorylierten lysosomalen Enzymen vom Golgi-Komplex und der Zelloberfläche zu den Lysosomen (Puertollano *et al.*, 2001). CD222 wird ubiquitär exprimiert und bindet sowohl an M6P (Mannose-6-Phosphat) als auch an IGF2 (*Insulin-like growth factor 2*). Etwa 90% der Moleküle sind demzufolge intrazellulär lokalisiert. Die restlichen 10% befinden sich auf der Plasmamembran (Morgan *et al.*, 1987). Weiterhin fungiert CD222 als ein positiver Regulator der T-Zell-Koaktivierung (Ikushima *et al.*, 2000). Allerdings wurde bisher keine Funktion in Zusammenhang mit PDCs beschrieben. Validierungsstudien sollten nun die Frage klären, ob CD222 ein Ligand von CD303 ist. Zu diesem Zweck wurden CD303L⁺ Zelllinien Jurkat und SK-MEL-5 (Abb. 15A) als auch CD303L⁻ Zelllinien Raji und MOLT-4 (Abb. 15C) extrazellulär mit dem CD222-spezifischen Antikörper gefärbt und durchflusszytometrisch am MACSQuant *Analyzer* analysiert. Die Auswertung ergab, dass das Färbemuster von CD222 nicht mit dem von rCD303 übereinstimmte. Während die Hälfte der Jurkat-Zellen CD222 auf der Zelloberfläche exprimierte, fehlte diese Expression auf SK-MEL-5-Zellen komplett. Stattdessen wurde eine minimale Expression von CD222 auf MOLT-4-Zellen beobachtet, die aber, wie zuvor gezeigt, keine Bindung von rCD303 auf der Zelloberfläche aufwiesen (Abb. 23).

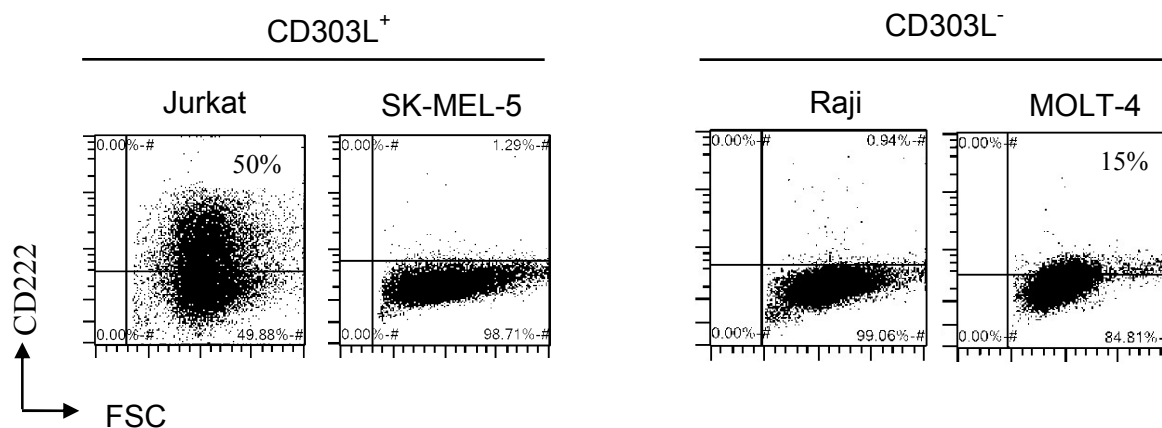


Abbildung 23. Expression von CD222 auf CD303L⁺ und CD303L⁻ Zelllinien

Jurkat-, SK-MEL-5-, Raji- und MOLT-4-Zellen wurden mit 1 µg/ml des CD222-spezifischen Antikörpers extrazellulär gefärbt und mittels Durchflusszytometrie am MACSQuant *Analyzer* analysiert.

Im nächsten Ansatz sollte die rCD303-Färbung auf SK-MEL-5-Zellen mittels eines polyklonalen CD222-Antikörpers geblockt werden. Aber auch hier konnte die Bindung von rCD303 an den Liganden auf der Zelloberfläche von SK-MEL-5-Zellen beim Einsatz von bis zu 20 µg/ml des CD222-Antikörpers nicht inhibiert werden (Abb. 24).

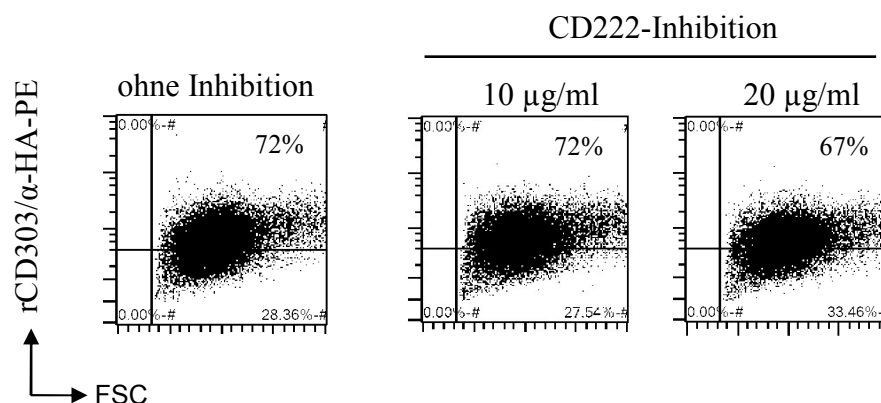


Abbildung 24. Inhibition der rCD303-Bindung durch den CD222-Antikörper

SK-MEL-5-Zellen wurden mit 10 bzw. 20 µg/ml des CD222-Antikörpers für 15 min bei 4°C vorinkubiert und anschließend standardmäßig mit 2,5 µg/ml rCD303 und α-HA-PE (1:11) in HBSS-Puffer für 10 min bei 4°C gefärbt, gewaschen und am MACSQuant *Analyzer* analysiert.

Für CD222 wurden einige Interaktionspartner beschrieben. Neben IGF2, bindet CD222 auch M6P. Die Vermutung lag nahe, dass M6P über die Kohlenhydrat-erkennende Domäne (CRD), die Mannosespezifität vorhersagt (Dzionek *et al.*, 2001; Weis *et al.*, 1998), an rCD303 gebunden hatte und CD222 aufgrund seiner affinen Bindung zu M6P per Zufall mit rCD303 beim LRC quervernetzt und isoliert werden konnte. Deshalb wurde als nächstes untersucht, ob eine Inhibition der rCD303-Bindung an SK-MEL-5-Zellen durch eine Vorinkubation mit M6P möglich war. Gegenteilige Ergebnisse wurden allerdings erzielt. Mit steigender Konzentration von M6P beobachtete man eine hellere Färbung des CD303L mit rCD303 (Abb. 25). M6P kann folglich die Bindestelle von rCD303 an den CD303L nicht blocken. Ob M6P die Affinität zur Bindung des eigentlichen Liganden in Form eines hochmolekularen Komplexes verstärkt oder einfach unspezifisch an der Zelloberfläche von SK-MEL-5 in einer titrationsabhängigen Art und Weise haftet, kann an dieser Stelle nicht beantwortet werden.

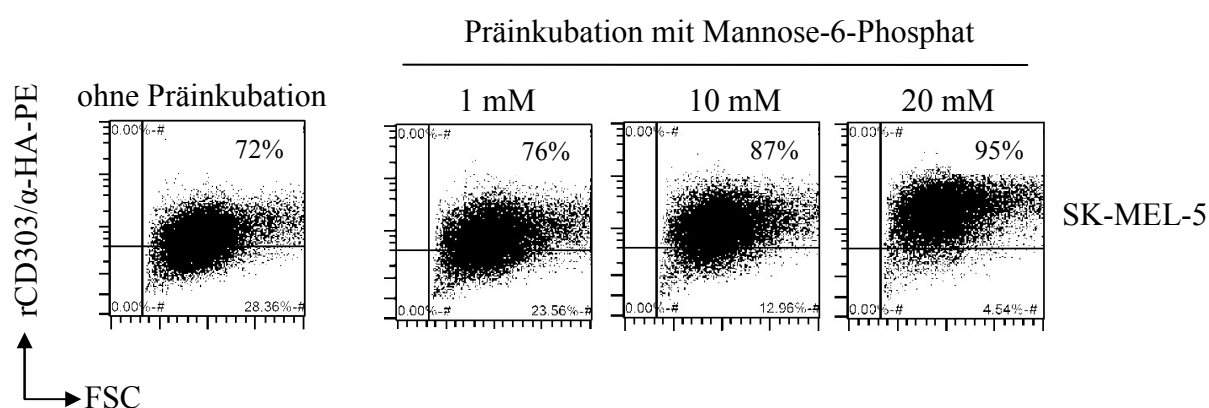


Abbildung 25. Verstärkung der rCD303-Bindung an CD303L durch M6P

SK-MEL-5-Zellen wurden mit 1 mM, 10 mM oder 20 mM Mannose-6-Phosphat (M6P) für 15 min bei 4°C vorinkubiert. Anschließend wurden die Zellen gewaschen und mit 2,5 µg/ml rCD303 und α-HA-PE (1:11) in HBSS-Puffer extrazellulär für 10 min bei 4°C gefärbt, gewaschen und durchflusszytometrisch analysiert.

CD222 konnte aufgrund dieser Ergebnisse nicht als CD303L bestätigt werden. Darüber hinaus führten mehrere Wiederholungen des LRC-Experiments mit einem neuen Produktionslot von rCD303 zu keiner signifikanten Anreicherung von CD222. Mögliche Ursachen könnten auf einer minimalen Lot-spezifischen Glykosylierungsvariabilität von rCD303 beruhen.

3.6 Generierung einer funktionellen NFAT-GFP-Reporterzelllinie

Die Isolation des CD303L gestaltete sich mit den bisherigen Methoden als sehr schwierig. Aus diesem Grund wurde ein alternativer Ansatz gewählt, der es ermöglichte auf die Funktionalität des CD303L mit Hilfe einer NFAT-GFP-Reporterzelllinie schließen zu können. Cao und Kollegen gelang es mit so einem System den Interaktionspartner von ILT7, einem Mitglied der *Ig-like transcript* (ILT) Familie, das unter anderem auf humanen PDCs exprimiert wird und mit Hilfe des Adaptormoleküls FcεRIγ (FcRγ) ein Signal weiterleiten kann, zuerst zu lokalisieren und anschließend mit Hilfe der Immunpräzipitation als BST2 zu identifizieren (Cao *et al.*, 2009). Die NFAT-GFP-Zelllinie, die für die Charakterisierung des CD303L eingesetzt wurde, stammte aus dem Labor von Prof. Dr. M. Colonna (Washington Universität, St. Louis), die er seinerseits von Prof. Dr. K. Karjalainen erhalten hat (Nanyang Technologische Universität, Singapur) (Bot *et al.*, 1996). Es handelte sich dabei um eine murine T-Zellhybridomlinie, die als A95-KK terminiert wurde und GFP unter der Kontrolle des NFAT-Promotors exprimiert. NFAT (*nuclear factor of activated T-cells*) sind Transkriptionsfaktoren, die in T-Lymphozyten exprimiert werden und nach Aktivierung der Zelle in den Nukleus einwandern, um die Expression von Zielgenen, im Falle der A95-KK-Zelllinie GFP, zu initiieren. Um eine funktionelle Interaktion von CD303 mit seinem Liganden zu erzielen, wurde die A95-KK-Zelllinie zum einen mit CD303, zum anderen auch mit seinem Adaptormolekül FcRγ, welches über die ITAM-Motive den Signalweg vermittelt, transfiziert (Röck *et al.*, 2007; Kolbe, 2010). Sowohl Einzel- als auch Doppeltransfektanten wurden generiert und subkloniert. Die Klone A95-KK.1E4 und A95-KK.3F3 exprimierten zu 56% bzw. 69% die FcRγ-Kette, die mit einem extrazellulären HA-Tag auf der Zelloberfläche

durchflusszytometrisch nachgewiesen werden konnte (Abb. 26). Die Einzeltransfektanten A95-KK.1A12 und A95-KK.3H10 exprimierten zu 96% das CD303-Molekül auf der Zelloberfläche, wodurch eine Interaktion mit dem CD303L vermittelt werden konnte, jedoch keine GFP-Induktion aufgrund fehlender FcR γ -Expression erwartet wurde (Abb. 26). Ergänzend zu den Einzeltransfektanten wurden Doppeltransfektanten generiert, mit deren Hilfe funktionelle CD303L⁺ Zelllinien identifiziert werden sollten (A95-KK.2H11: 75% CD303⁺FcR γ ⁺, A95-KK.1H5: 59% CD303⁺FcR γ ⁺) (Abb. 26).

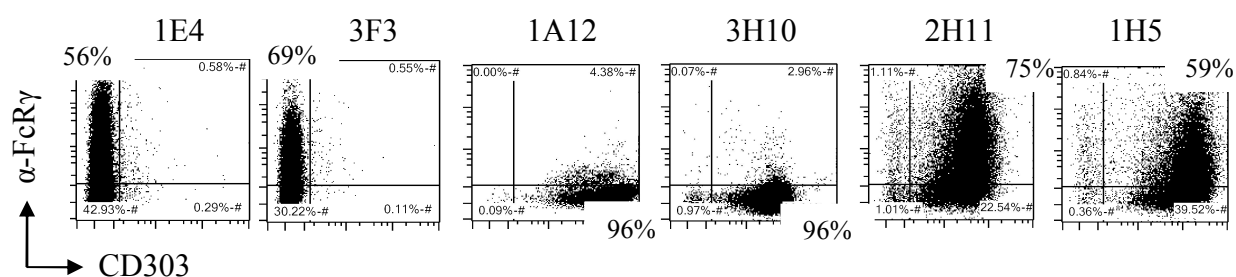


Abbildung 26. Etablierung einer funktionellen A95-KK NFAT-GFP-Reporterzelllinie

A95-KK-Zellen wurden entweder mit dem FcR γ - bzw. mit dem CD303-kodierenden Plasmid oder einer Kombination aus beiden Plasmiden transfiziert. Klone, die aus der Transfektion hervorgingen, wurden zur stabilen Expression der Marker unter Selektionsdruck (CD303-5 μ g/ml Blasticidin S, FcR γ -700 μ g/ml Zeocin, GFP-250 μ g/ml G418) subkloniert. Der Nachweis der FcR γ -Kette erfolgte über den HA-Tag mit α -HA-Biotin und α -Biotin-APC. CD303 wurde mit CD303-PE und GFP im FITC-Kanal durchflusszytometrisch am MACSQuant Analyzer analysiert.

Um die Ergebnisse der Durchflusszytometrie zu überprüfen, wurde die FcR γ -Kette im Western Blot mit spezifischen Antikörpern detektiert. Ein spezifischer Nachweis der FcR γ -Kette wurde, wie erwartet, in polyklonalen CD303 und FcR γ transient transfizierten A95-KK-Zellen und in der stabilen A95-KK.1H5-Doppeltransfektante, aber nicht in untransfizierten Zellen bzw. in der CD303-Einzeltransfektante erbracht. Die hämatopoetische Rattenleukämie-Zelllinie RBL-1 diente dabei als positive Kontrolle (Abb. 27).

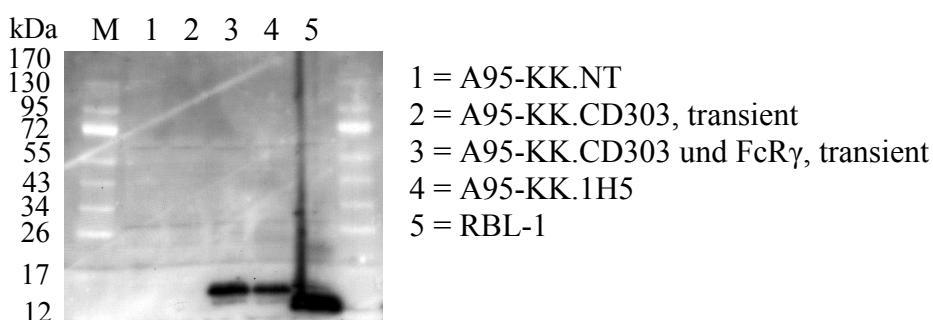


Abbildung 27. Western Blot-Analyse zum Nachweis der FcR γ -Expression

5x10⁵ Nicht-transfizierte (NT) Zellen, transient transfizierte CD303-Einzeltransfektanten, transient und stabil (A95-KK.1H5) CD303 und FcR γ -doppeltransfizierte Zellen und RBL-1-Zellen wurden in 50 μ l Lysepuffer lysiert. Das Gesamtproteom (20 μ l des Totallysats) wurde elektrophoretisch auf einem 10-20%igen Tris-Glycin-Gel aufgetrennt und anschließend auf eine PVDF-Membran transferiert. Der Nachweis der FcR γ -Kette erfolgte über eine 1-stündige Inkubation mit 0,5 μ g/ml des Primärantikörpers Kaninchen α -Mensch FcR γ und danach über eine 1-stündige Inkubation mit dem Sekundärantikörper Ziege α -Kaninchen-HRP (1:10000). Die durch die Umsetzung des ECL-Substrats resultierende Chemolumineszenz wurde für eine autoradiographische Abbildung der FcR γ -Kette auf einem Fotofilm genutzt.

3.6.1 Induktion von GFP in der A95-KK-Reporterzelllinie nach spezifischer Stimulation

Nachdem die A95-KK NFAT-GFP-Reporterzelllinie mit den notwendigen Komponenten zur Identifikation eines funktionellen CD303L erfolgreich stabil transfiziert wurde, wurde getestet, ob eine GFP-Induktion initiiert werden konnte. Die Induktion des NFAT-Signalweges ist stark Ca²⁺-abhängig. Ca²⁺ bindet an den Ca²⁺-Sensor Calmodulin, welcher anschließend die Serin/Threonin Phosphatase Calcineurin aktiviert. Calcineurin dephosphoryliert NFAT, wodurch eine Translokation von NFAT in den Nukleus erfolgt und die Expression von GFP induziert wird. Der über CD303-vermittelte Signalweg basiert ebenfalls auf einer Ca²⁺-Mobilisierung, wie es nach der Bindung eines spezifischen CD303-Antikörpers (AC144) gezeigt wurde (Dzionek *et al.*, 2001; Röck *et al.*, 2007). Die Signalinduktion durch den Antikörper wurde als eine positive Kontrolle für die effiziente Stimulation des CD303-Rezeptors und seines Signalvermittlungsadaptormoleküls der FcR γ -Kette gewählt. Wie man anhand Abb. 28 erkennen kann, exprimierten ca. die Hälfte der A95-KK.2H11-Zellen GFP nach 15 h Stimulation mit 1 μ g/ml des AC144-Antikörpers, wohingegen die Stimulation mit einer Isotypkontrolle keine GFP-Expression induzierte. Das Mitogen Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA) und der Ionophor Ionomycin wurden zur allgemeinen Zellaktivierung unabhängig von der CD303- und FcR γ -Expression eingesetzt. Während PMA die zelluläre Proteinkinase C aktiviert, bewirkt Ionomycin einen Anstieg der intrazellulären Ca²⁺-Konzentration aufgrund einer Zunahme der Membranpermeabilität (Nishizuka, 1984; Imaoka *et al.*, 1983) und führt dadurch zur Aktivierung von NFAT, welches GFP induziert, wie das anhand der Stimulation der Zelllinie A95-KK.2H11 gezeigt werden konnte. Über 80% der Zellen exprimierten GFP nach einer Aktivierung mit 10 ng/ml PMA und 1 μ g/ml Ionomycin (Abb. 28).

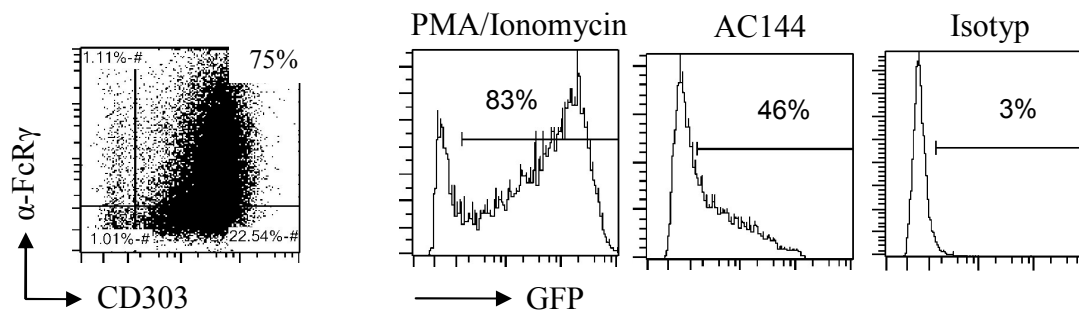


Abbildung 28. Stimulation von A95-KK.2H11-Zellen zur Induktion der GFP-Expression

Die NFAT-GFP A95-KK.2H11-Reporterzelllinie, die bereits in Abb. 26 im Hinblick auf die Expression von CD303 und FcR γ dargestellt wurde, ist links abgebildet. 1×10^5 Zellen wurden in 100 μ l Gesamtvolumen mit 10 ng/ml PMA und 1 μ g/ml Ionomycin oder 1 μ g/ml des AC144- bzw. α -CK3-Antikörpers für 15 h bei 37°C und 5% CO₂-Gehalt inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit CD303-PE und α -HA-Biotin/ α -Biotin-APC zur Detektion der FcR γ -Kette gefärbt. GFP-Expression wurde im FITC-Kanal durchflusszytometrisch am MACSQuant *Analyzer* bestimmt.

Die lösliche Form von AC144 induzierte eine effiziente Induktion der GFP-Expression in der Reporterzelllinie. Um zu prüfen, ob AC144 auch in gebundener Festphaseform zur GFP-Induktion führen kann, wurde AC144 in zwei verschiedenen Konzentrationen [3 μ g/ml (*low*-Konjugat) und 30 μ g/ml (*high*-Konjugat)] über Biotin und α -Biotin an MACSiBeads gebunden, da vermutet wurde, dass der CD303L membrangebunden und nicht gelöst vorliegt, weil er auf der Zelloberfläche von mehreren Zelllinien und Primärzellen nachgewiesen werden konnte (Abb. 15A, B). MACSiBeads sind superparamagnetische Partikel, die einen Durchmesser von 3,5 μ m aufweisen³ und somit annähernd mit der Größe von Zellen vergleichbar sind. Die Effizienz der MACSiBeads-Partikel wurde im Zusammenhang mit T-Zellaktivierung und Zellexpansion gezeigt, bei der biotinylierte Antikörper gegen CD2, CD3 und CD28 an MACSiBeads gebunden und in der Zellkultur eingesetzt wurden (Diveu *et al.*, 2009; Camargo *et al.*, 2009).

Die A95-KK-Reporterzellen ließen sich effizient mit dem *high*-Konjugat der AC144-MACSiBeads stimulieren. Es bestand fast kein Unterschied in der Stimulationseffizienz der Zellen beim Einsatz von 60 ng/ml bzw. 150 ng/ml des *high*-Konjugats, sodass bereits 60 ng/ml der AC144-MACSiBeads zur Aktivierung von 55% der NFAT-GFP-Zellen ausreichend waren (Abb. 29). Die erhöhte Stimulationseffizienz der AC144-MACSiBeads im Vergleich zur löslichen Form von AC144, wovon 1 μ g/ml zur Stimulation von 46% der

³ http://www.miltenyibiotec.com/en/PG_110_302_Anti_Biotin_MACSiBead_Particles.aspx

Zellen eingesetzt wurde (Abb. 28), lässt sich durch die multivalente Bindung des Festphasen-antikörpers erklären.

Dass die Spezifität des CD303-Signalweges über CD303 in Kombination mit der FcR γ -Kette vermittelt wird, erkennt man anhand Abb. 29. Die CD303-Einzeltransfektante (polyklonal, nicht subkloniert) lässt sich nämlich nicht mit AC144 stimulieren.

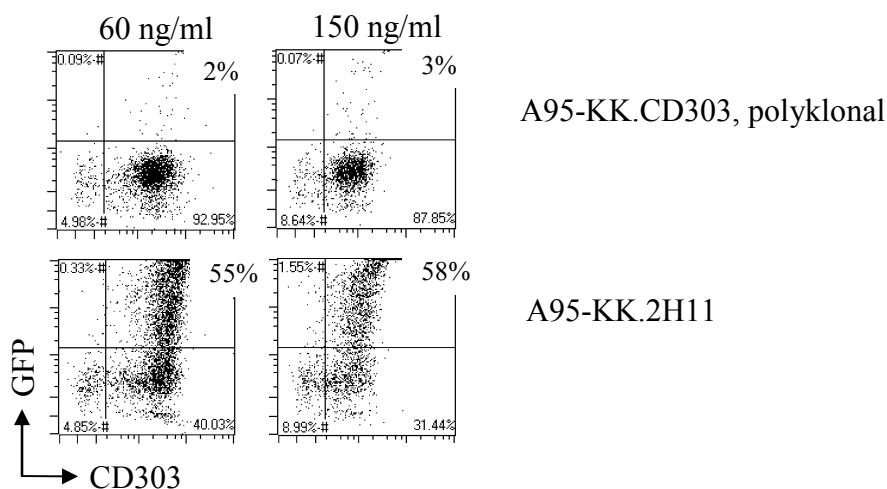


Abbildung 29. AC144-MACSiBeads induzieren GFP-Expression in A95-KK.2H11 NFAT-GFP-Reporterzellen

AC144-Biotin wurde als *high*-Konjugat (30 μ g/ml) an α -Biotin-MACSiBeads gebunden und in einer Konzentration von 60 ng/ml und 150 ng/ml zur Stimulation von polyklonalen A95-KK.CD303- bzw. A95-KK.2H11-Zellen in einer 96-Well Platte (Rundboden) eingesetzt. Zellen wurden für 22 h kultiviert und die Frequenz GFP-exprimierender Zellen konnte durchflusszytometrisch im FITC-Kanal am MACSQuant *Analyzer* bestimmt werden.

3.7 Identifikation einer CD303L⁺ funktionellen Zelllinie

Einige CD303L⁺ Zelllinien konnten, wie zuvor beschrieben, mit dem rekombinanten CD303 Protein in der Durchflusszytometrie identifiziert werden (Abb. 15A, B). Es stellte sich die Frage, ob der Ligand auf diesen Zellen auch eine Funktion ausübt. Wenn dies der Fall wäre, so würde man eine Induktion der GFP-Expression nach Kokultivierung dieser Zellen mit der A95-KK NFAT-GFP-Reporterzelllinie erwarten. Um diese Hypothese zu untersuchen, wurden in einem ersten Ansatz die in der Publikation von Cao und Kollegen beschriebenen BST2⁺ Zelllinien unter den gleichen Bedingungen mit der Reporterzelllinie kultiviert (Cao *et al.*, 2009). Neben der CD303⁺FcR γ ⁺ Doppeltransfektante A95-KK.2H11, wurden auch nicht transfizierte und CD303⁺ bzw. FcR γ ⁺ A95-KK-Einzeltransfektanten als Kontrollen eingesetzt. Wie erwartet und anhand Abb. 30 erkennbar, induzierte die allgemeine Aktivierung mit PMA/Ionomycin in allen verwendeten Zelllinien GFP. Die über CD303-vermittelte Stimulation mit

dem löslichen AC144-Antikörper bzw. mit AC144-MACSiBeads bewirkte eine spezifische GFP-Expression in der Doppeltransfektante A95-KK.2H11 und nicht in den Kontrollzelllinien. Allerdings wurde kein GFP-Signal nach Kokultur mit den CD303L⁺ Brustkrebs-Zelllinien MCF-7 und T47D detektiert. Auch die Inkubation mit der CD303L⁻ T-Zell-Leukämie-Zelllinie MOLT-4 führte zu keiner GFP-Induktion in der NFAT-GFP-Reporterzelllinie (Abb. 30).

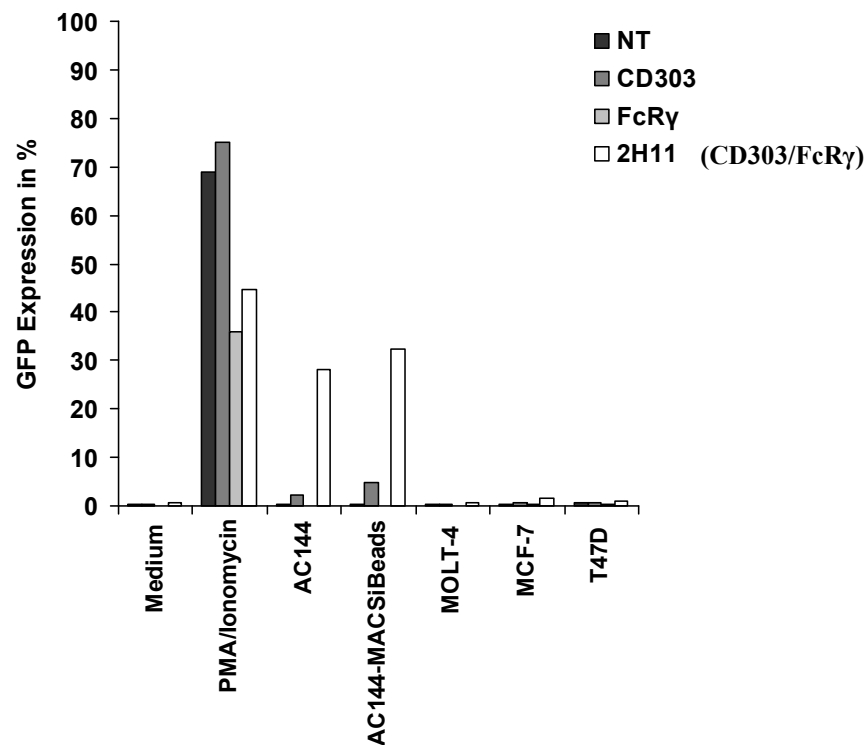


Abbildung 30. Kokultur von A95-KK NFAT-GFP-Reporterzellen mit den Zielzelllinien MOLT-4, MCF-7 und T47D

Jeweils 1×10^5 MOLT-4-, MCF-7- und T47D-Zellen wurden mit jeweils 2×10^5 A95-KK.NT-, A95-KK.CD303-, A95-KK.FcR γ (Subklon 1E4)-Zellen bzw. der Doppeltransfektante A95-KK.2H11 für 16 h in einer 48-Well Platte (Flachboden) in 250 μ l Gesamtvolumen kultiviert. Als Kontrolle wurden die Reporterzellen entweder im Medium, mit 10 ng/ml PMA und 1 μ g/ml Ionomycin, mit 1 μ g/ml AC144 oder 60 ng/ml AC144-MACSiBeads (*high*-Konjugat) kultiviert. Anschließend wurde der Anteil GFP-exprimierender Reporterzellen durchflusszytometrisch am MACSQuant *Analyzer* analysiert. Das Experiment wurde mehrfach mit variablen Kulturbedingungen durchgeführt und stellt ein repräsentatives Beispiel dar.

Um die Kokulturbedingungen zu optimieren, wurde eine Vorinkubation der Zielzellen mit rekombinantem Interferon-alpha (rIFN- α), wie durch Cao und Kollegen vorgeschlagen (Cao *et al.*, 2009), hinzugezogen. CD303L⁺ SK-MEL-5- und HeLa- sowie CD303L⁻ Raji-Zellen wurden für 46 h ohne und mit 500 U/ml rIFN- α kultiviert und anschließend mit entsprechenden Reporterzellen koinkubiert. Um eine unspezifische Aktivierung der A95-KK-Zellen

durch rIFN- α zu kontrollieren, wurden die Zellen in Anwesenheit von rIFN- α kultiviert. Ebenso wurde getestet, ob CpG-A Oligonukleotide, die zur Stimulation von PDCs eingesetzt werden (Krug *et al.*, 2001a), eine CD303-spezifische GFP-Expression induzieren können. Die Auswertung des Kokulturansatzes ergab, dass keine GFP-Expression aktiviert werden konnte. Auch eine Vorinkubation der SK-MEL-5-, HeLa- und Raji-Zellen mit rIFN- α induzierte keine Expression eines funktionellen Liganden, der ein Signal in der Reporterzelllinie nach Kokultur hätte auslösen können (Abb. 31).

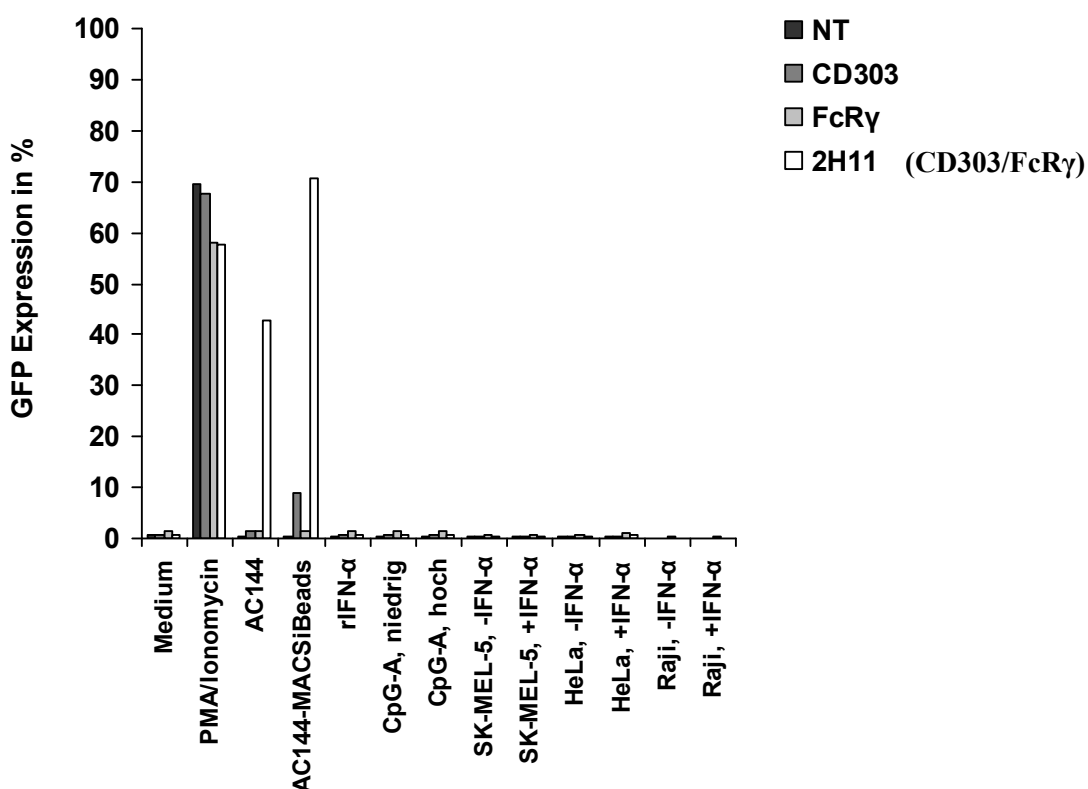


Abbildung 31. Kokulturansatz der NFAT-GFP-Reporterzellen mit Zielzellen, die zuvor mit rIFN- α inkubiert wurden

SK-MEL-5-, HeLa -und Raji-Zellen wurden ohne und in Anwesenheit von 500 U/ml rIFN- α für 46 h in einer 48-Well Platte (Flachboden) kultiviert. Anschließend erfolgte der Kokulturanatz mit NFAT-GFP-Reporterzellen, wie in Abb. 30 beschrieben. Zusätzlich wurden die Zellen separat mit 500 U/ml rIFN- α , 2 μ g/ml (niedrig) und 20 μ g/ml (hoch) CpG-A kultiviert. Die Frequenz GFP-exprimierender Zellen ist angegeben in %. Das Experiment wurde mehrfach mit variablen Kulturbedingungen durchgeführt und stellt ein repräsentatives Beispiel dar.

Weitere CD303L⁺ und CD303⁻ Zellen, die in Kapitel 3.3 beschrieben wurden, wurden mit der Reporterzelllinie kokultiviert. Jedoch konnte kein positives Signal detektiert werden.

Es stellte sich die Frage, ob die gewählten Kokulturbedingungen für das System nicht optimal und deshalb verbesserungsfähig waren. Aus diesem Grund wurden unterschiedliche Parameter getestet. Zum einen wurde die Größe der Multiwell-Kulturplatten variiert (96-, 48- und 24-Well). Zum anderen wurden unterschiedliche Mischungsverhältnisse zwischen der Ziel- und Reporterzelllinie (1:2, 1:3, 1:4, 1:5, 1:8 und 3:1), aber auch unterschiedliche Kokulturreiten (1-2 Tage) getestet. Allerdings führten auch diese Optimierungen zu keiner GFP-Induktion in der Reporterzelllinie (Daten repräsentativ in Abb. 30 und Abb. 31 gezeigt).

3.7.1 Verstärkung der Signalintensität durch den Einsatz einer sensitiveren Reporterzelllinie

Aufgrund einer fehlenden GFP-Expression nach den bisherigen Ansätzen wurde die Sensitivität der A95-KK.2H11 NFAT-GFP-Zelllinie untersucht. Diese war ausreichend um die Expression von GFP nach Bindung des spezifischen Antikörpers AC144 in der Reporterzelllinie zu induzieren. Es ist jedoch denkbar, dass der CD303L eine geringere Affinität zum Rezeptor aufweist und die Sensitivität des Reporters zur Aktivierung der Zelle dadurch ineffizient war. Zur Klärung dieser Frage wurde die Sensitivität der A95-KK.2H11-Zellen erhöht. Dazu wurde die Zelllinie mit 1 µg/ml AC144 über Nacht kultiviert und einzelne GFP-exprimierende Zellen mit Hilfe der FACS-Sortierung subkloniert. Die Sensitivität der neuen Klone wurde mit einer erneuten AC144-Stimulation überprüft. Es konnten dabei zwei Klone, A95-KK.2H11.2C7 und A95-KK.2H11.2H10, mit GFP-Expressionsraten von 95% identifiziert und expandiert werden (Abb. 32). Dieses Experiment wurde von T. Ozimkowski (Miltenyi Biotec) durchgeführt, der die A95-KK.2H11.2C7-Zelllinie für weitere Kokulterversuche zur Verfügung stellte.

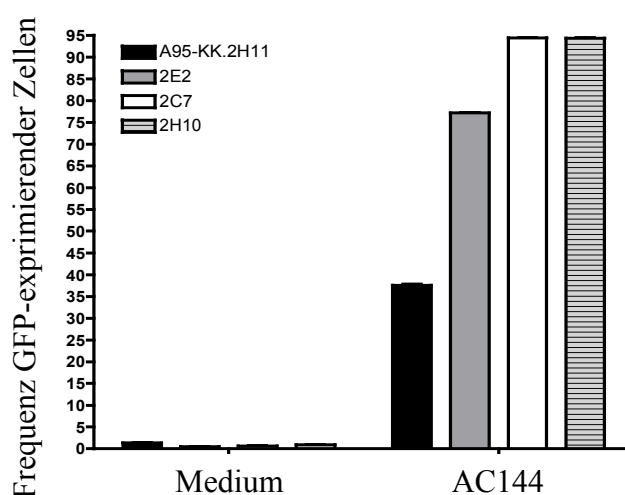


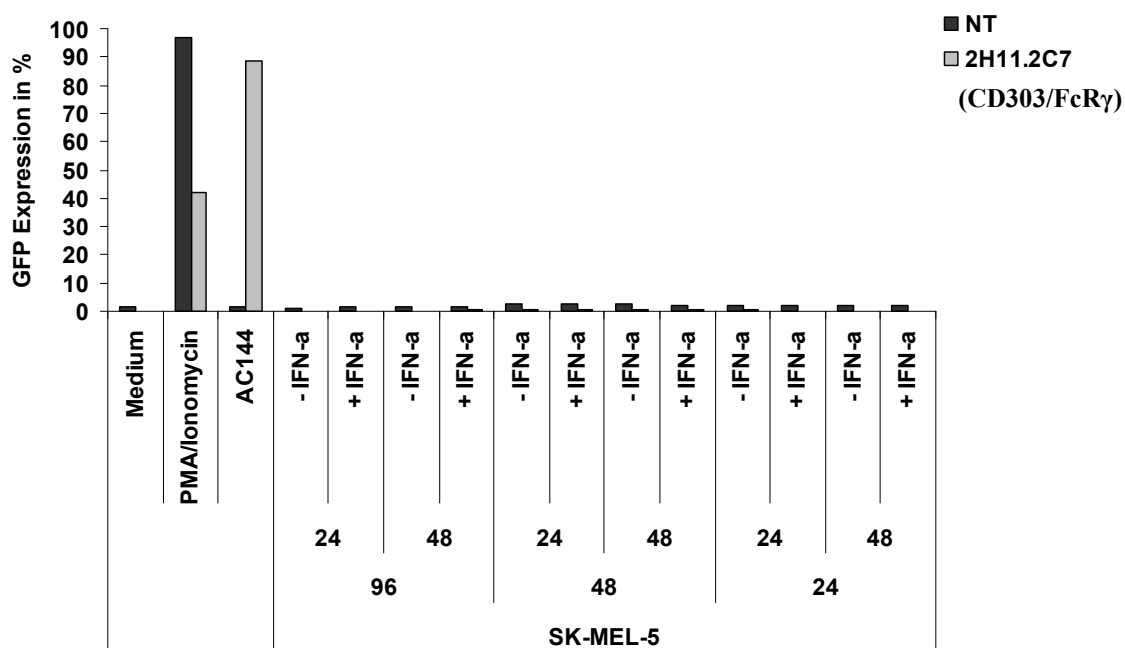
Abbildung 32. Subklonierung der A95-KK.2H11-Zelllinie

A95-KK.2H11-Zellen wurden mit 1 µg/ml AC144 über Nacht kultiviert. Zellen mit hoher GFP-Expression wurden FACS-sortiert, expandiert und gesichert. Diese Subklone wurden erneut mit 1 µg/ml AC144 stimuliert. Der Anteil GFP-exprimierender Zellen ist angegeben in %. Das Experiment wurde von T. Ozimkowski (Miltenyi Biotec) durchgeführt.

3.7.2 Identifikation einer funktionellen CD303L⁺ Zelllinie mit Hilfe der A95-KK.2H11.2C7 NFAT-GFP-Reporterzelllinie

Zwei CD303L⁺ Zelllinien, SK-MEL-5 und Jurkat, wurden beispielhaft ausgewählt, um die Effizienz des sensitiven A95-KK.2H11.2C7-Reporters im Hinblick auf die GFP-Induktion zu analysieren. Unterschiedliche Parameter wurden dabei getestet. Die Präinkubation der Zielzellen mit rIFN-α wurde von 2 auf 5 Tage in unterschiedlichen Kulturplatten (24-Well und 48-Well) verlängert. Anschließend wurden diese Zellen und mit nicht transfizierten bzw. A95-KK.2H11.2C7-Zellen in diversen Multiwell-Platten (96-Well, 48-Well und 24-Well) kokultiviert. Allerdings blieben auch hier die Ergebnisse negativ. Es konnte keine GFP-Expression in der Reporterzelllinie induziert und nachgewiesen werden (Abb. 33A und B).

(A)



(B)

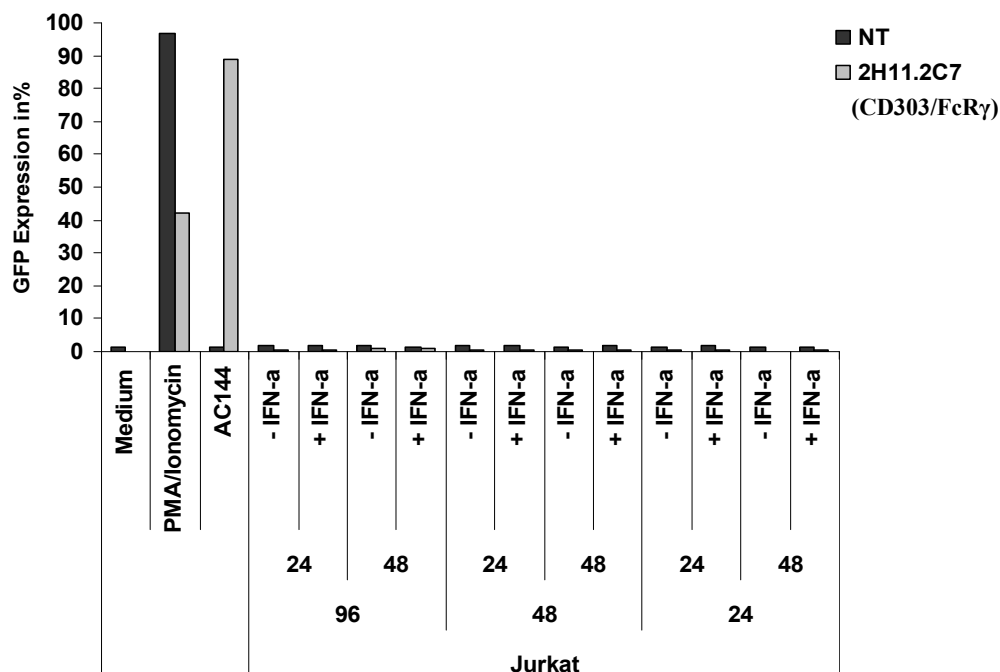


Abbildung 33. Kokultur der A95-KK.2H11.2C7-Reporterzelllinie zur Identifikation eines funktionellen CD303L

(A) 1×10^6 SK-MEL-5-Zellen wurden für 5 Tage ohne und mit 500 U/ml rIFN- α in einer 24-Well Platte (Gesamtvolumen: 600 μ l) bzw. einer 48-Well-Platte (Gesamtvolumen: 250 μ l) bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert. Anschließend wurden die Zellen von der Kulturgefäßoberfläche gelöst und in einem Verhältnis von 1:2 mit untransfizierten und A95-KK.2H11.2C7-Reporterzellen in unterschiedlichen Zellkulturplatten (96-Well, 48-Well und 24-Well) über Nacht kokultiviert. Positive Kontrollen wurden, wie in Abb. 30 beschrieben, eingesetzt. Die Frequenz GFP-exprimierender Zellen ist in % dargestellt.

(B) Analog zu A wurden Jurkat-Zellen eingesetzt, die nach der Präinkubation mit rIFN- α nicht abgelöst werden mussten, da sie in Suspension kultiviert werden.

Das Experiment wurde 2 mal durchgeführt und stellt ein repräsentatives Ergebnis dar.

3.7.3 Kokultur von rCD222 und seinen Liganden mit NFAT-GFP-Reporterzellen

Im Kapitel 3.5 wurde CD222 durch den Einsatz der LRC-Technologie als ein CD303L vorgeschlagen. Jedoch scheiterten anschließende Validierungsversuche CD222 auf der Zelloberfläche von SK-MEL-5-Zellen nachzuweisen (vgl. Kapitel 3.5.1). Da für CD222 bereits einige Interaktionspartner beschrieben wurden, stellte sich die Frage, ob ein größerer molekularer Komplex zur Aktivierung der A95-KK NFAT-GFP-Zellen führen könnte. Ein solcher Mechanismus wurde bereits für IL-15, das von der IL-15R- α -Kette trans-präsentiert wird, gezeigt (Burkett *et al.*, 2004; Mortier *et al.*, 2006; Stonier und Schluns, 2010). Zu diesem Zweck wurden diverse CD222-Liganden alleine und in Kombination mit dem rekombinanten CD222

(rCD222)-Protein mit der Reporterzelllinie kokultiviert. Im Falle einer Aktivierung durch rCD222 sollte die Induktion der GFP-Expression mit einem polyklonalen CD222-spezifischen Antikörper geblockt werden. Alternativ sollte geprüft werden, ob der Einsatz des Antikörpers zu einer besseren Präsentation von rCD222 und dadurch zur Aktivierung des Reporters führte könnte. Außer in den positiven Kontrollen wurde nach einer Übernachtskultur allerdings kein spezifisches GFP-Signal in den jeweiligen Ansätzen detektiert (Abb. 34).

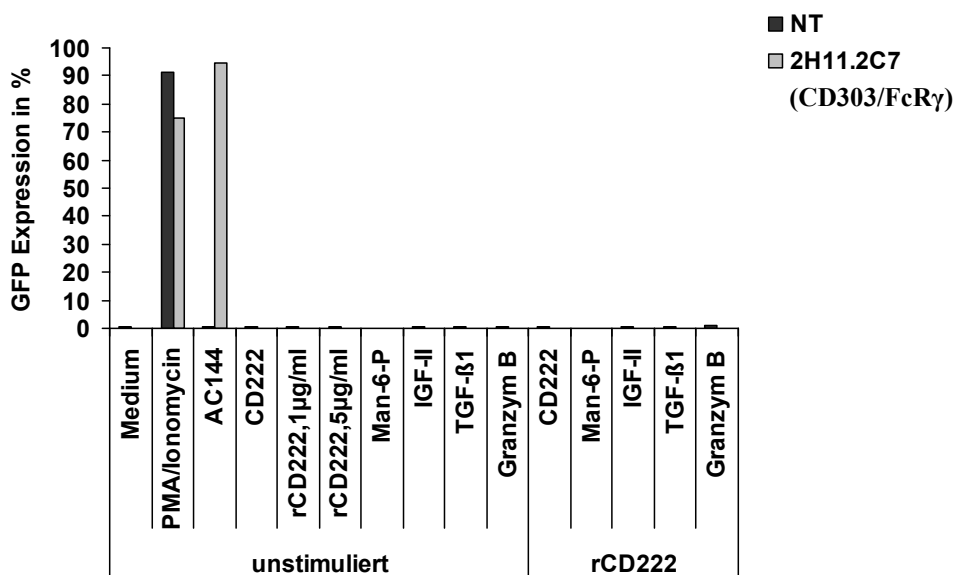


Abbildung 34. Kokultur der A95-KK.2H11.2C7-Zelllinie mit CD222 und seinen Liganden

1×10^5 Reporterzellen wurden mit folgenden Komponenten entweder alleine oder in Kombination mit rCD222 für 18 h in einer 96-Well Kulturplatte (Rundboden) in 100 µl Medium kultiviert:

10 ng/ml PMA und 1 µg/ml Ionomycin, 1 µg/ml AC144, 1 µg/ml CD222, 1 µg/ml bzw. 5 µg/ml rCD222, 1 µg/ml rCD222 und 20 mM Mannose-6-Phosphat, 1 µg/ml rCD222 und 1 µg/ml IGF-II, 1 µg/ml rCD222 und 10 ng/ml TGF-β1, 1 µg/ml rCD222 und 0,25 µg/ml Granzym B

Der Anteil GFP-exprimierender Zellen ist dargestellt in %.

3.7.4 Kokultur des NFAT-GFP-Reporters mit kommensalen Pilzen zur Identifikation eines funktionellen CD303L

Für viele C-Typ-Lektine wurde beschrieben, dass sie Zellwandkomponenten von verschiedenen Pilzarten binden. Die Zellwand von Pilzen besteht hauptsächlich aus Kohlenhydraten wie Mannanen (Polymere der Mannose), β-Glucanen (Polymere der β-glykosidisch verknüpften D-Glucose) und Chitinen (Polymere der N-Acetyl-D-Glykosamine). Die Spezifität der Zuckerbindung wird dabei durch die Kohlenhydrat-erkennende Domäne (CRD) vermittelt

(Sharon und Lis, 1972; Figdor *et al.*, 2002; LeibundGut-Landmann *et al.*, 2007). So erkennt der Makrophagen Mannose-Rezeptor (MR) terminale α -(1,2)/(1,3)-Mannose von N-verlinkten Mannanen und SIGNR-1 verzweigte α -Mannane, während Galectin-3 β -(1, 2)-Mannane bindet (Poulain und Jouault, 2004; Cambi *et al.*, 2008; Netea *et al.*, 2008). Dectin-1 erkennt β -Glucane, wohingegen Dectin-2 α -Mannane bindet, wodurch Immunität gegen Pilzinfektionen vermittelt wird (Brown *et al.*, 2003; Taylor *et al.*, 2007; Saijo *et al.*, 2007; Saijo *et al.*, 2010). Um zu untersuchen, ob CD303 ebenfalls funktionelle Komponenten von Pilzzellwänden bindet, wurde die A95-KK.2H11 NFAT-GFP-Reporterzelllinie mit unterschiedlichen Konzentrationen von Pilzlysaten zweier opportunistischer Arten (Schimmelpilz: *Aspergillus fumigatus* und Hefepilz: *Candida albicans*) kokultiviert. Jedoch wurde auch nach dieser Kokultur kein signifikantes GFP-Signal ausschließlich der positiven Kontrollen detektiert (Abb. 35).

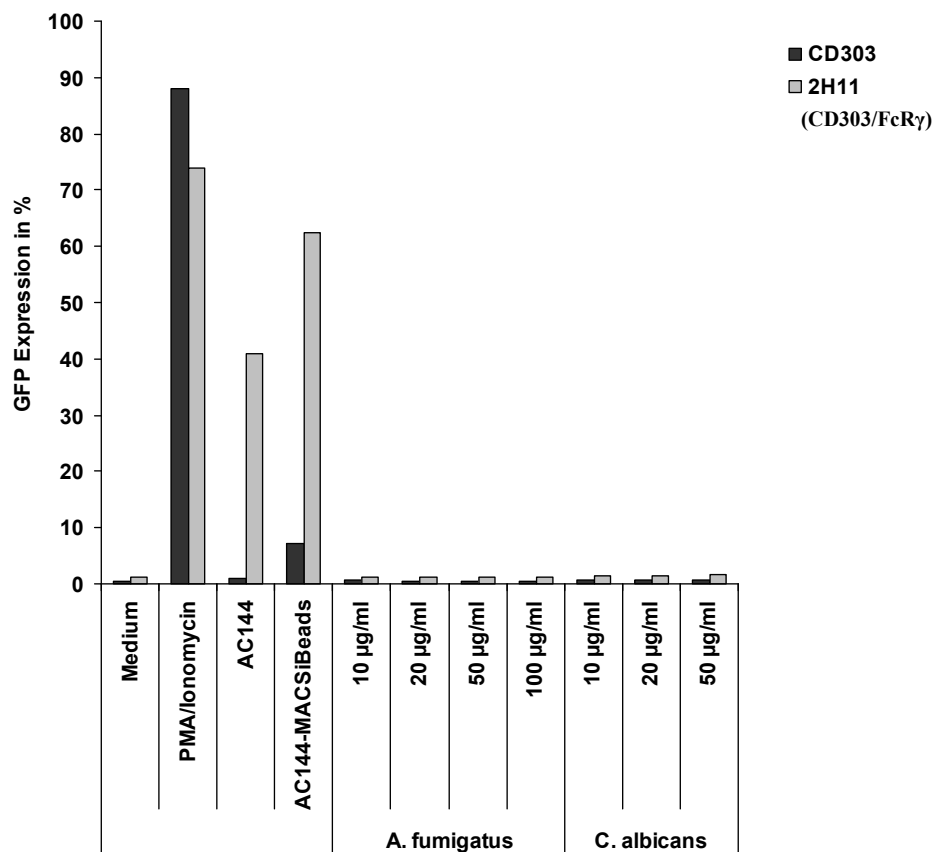


Abbildung 35. Kokultur von A95-KK.2H11 mit *A. fumigatus* und *C. albicans*

2×10^5 Reporterzellen (A95-KK.NT und A95-KK.2H11) wurden mit 10 μ g/ml, 20 μ g/ml, 50 μ g/ml (und im Falle von *A. fumigatus* mit 100 μ g/ml) des Myzel-Lysats von *Aspergillus fumigatus* oder Hyphen-Lysats von *Candida albicans* über Nacht in 100 μ l Totalvolumen einer 96-Well Kulturplatte (Rundboden) bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert. Die Frequenz GFP-exprimierender Zellen ist angegeben in %.

3.7.4.1 Zucker-basierte Induktion von GFP in der A95-KK-Reporterzelllinie

Wie im Kapitel zuvor beschrieben, spielt die Zuckererkennung durch C-Typ-Lektine eine entscheidende Rolle in der Vermittlung der Immunität. Ergänzend zu den beschriebenen Pilzstudien und der Tatsache, dass diverse Zuckerliganden für C-Typ-Lektine identifiziert wurden (Cambi und Figdor, 2003; Appelmelk *et al.*, 2003; Fukuda *et al.*, 1999; Van Liempt *et al.*, 2004; Timpano *et al.*, 2008), wurden verschiedene auf der Trägersubstanz Polyacrylamid (PAA)-immobilisierte und biotinylierte Polymere von Mono-, Di-, Tri- und Tetrasacchariden kommerziell erworben und in Kokultursversuchen eingesetzt. Unterschiedliche Konzentrationen (40 µg/ml und 100 µg/ml) und Inkubationszeiten (18 h, 19 h, 41 h und 44 h) wurden getestet. Es konnte allerdings kein GFP-Signal in der Reporterzelllinie durch folgende Zuckerstrukturen induziert werden: α - und β -D-Glucose (Monosaccharide), α - und β -D-Galactose (Monosaccharide), α - und β -D-Mannose (Monosaccharide), α -L-Fucose (Monosaccharid), β -N-Acetyl-D-glucosamin (Monosaccharid), Chitobiose (Disaccharid), Lewis X (Trisaccharid) und Lewis Y (Tetrasaccharid) und Sialyl-Lewis X (Tetrasaccharid) (Abb. 36).

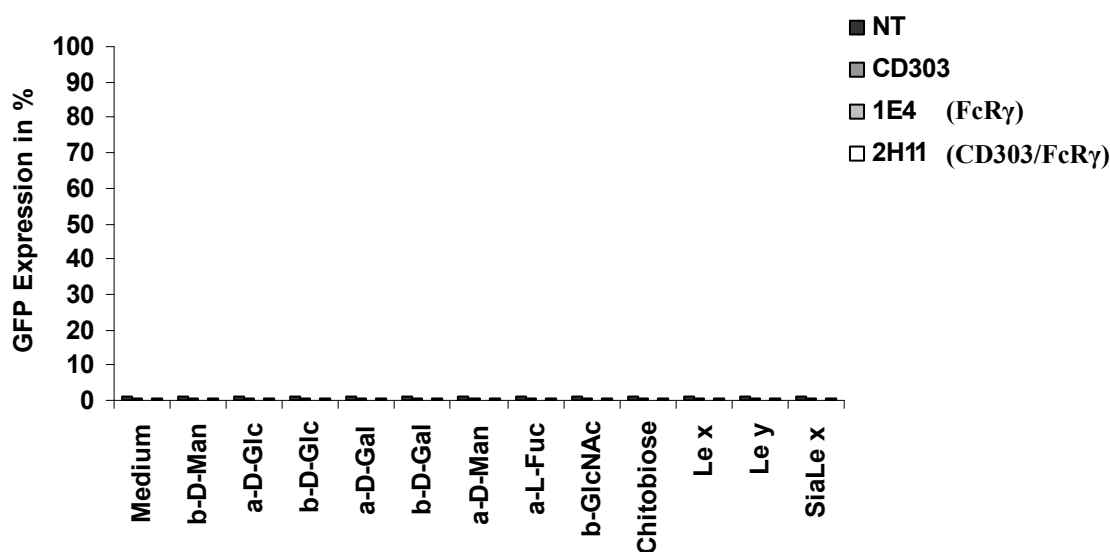


Abbildung 36. Kokultur von A95-KK-Reporterzellen mit diversen Sacchariden

Jeweils 100 µg/ml von α - und β -D-Glucose (Glc), α - und β -D-Galactose (Gal), α - und β -D-Mannose (Man), α -L-Fucose (Fuc), β -N-Acetyl-D-glucosamin (GlcNAc), Chitobiose, Lewis X und Y (Le) und Sialyl-Lewis X (SiaLe X) wurden 18 h bzw. 41 h (hier exemplarisch dargestellt) mit 1×10^5 NFAT-GFP-Reporterzellen in einer 96-Well Platte kokultiviert. Der Anteil GFP-exprimierender Zellen ist dargestellt in %.

Weiterhin konnte keine extrazelluläre Bindung der Zuckerstrukturen auf der Zelloberfläche von A95-KK-Zellen basierend auf dem Nachweis der Biotin-Modifikation der Zuckerpoly-

mere detektiert werden, obwohl der funktionelle Nachweis dieser Strukturen im Streptavidin-spezifischen ELISA erbracht wurde (Daten nicht gezeigt).

Die getesteten linearen polymeren Saccharide können somit als funktionelle CD303L ausgeschlossen werden.

3.7.5 Kokultur der NFAT-GFP-Reporterzelllinie mit HIV-1

Die Erkennung von pathogenen Strukturen wie Bakterien, Viren, Parasiten und Pilze (vgl. Kapitel 3.7.4) ist ein wichtiges Charakteristikum der Ca^{2+} -abhängigen C-Typ-Lektine. So belegten Studien von Xu und Kollegen im Jahre 2009 eine Interaktion von CD303 mit dem Antigen HBsAg, welches auf der Oberfläche des Hepatitis B Virus exprimiert wird (Xu *et al.*, 2009). Im Jahre 2007 wurde die Bindung des rekombinanten Hüllproteins gp120 des Humanen Immundefizienz-Virus Typ 1 (HIV-1) an CD303 gezeigt, was zur Inhibition der IFN- α -Sekretion durch PDCs führte (Martinelli *et al.*, 2007). Um diese Daten zu validieren, wurde mit CD44-MicroBeads aufgereinigtes und inaktiviertes HIV-1 aus Zellkulturüberständen einer PBMC-Kultur, die mit dem Stamm BRU infiziert und mit PHA/Ionomycin stimuliert wurde, mit der A95-KK.2H11.2C7 NFAT-GFP-Reporterzelllinie für 45 h kokultiviert. Die Auswertung der durchflusszytometrischen Analyse ergab, dass keine GFP-exprimierenden Zellen nach Kokultur mit HIV-1 detektiert werden konnten (Abb. 37).

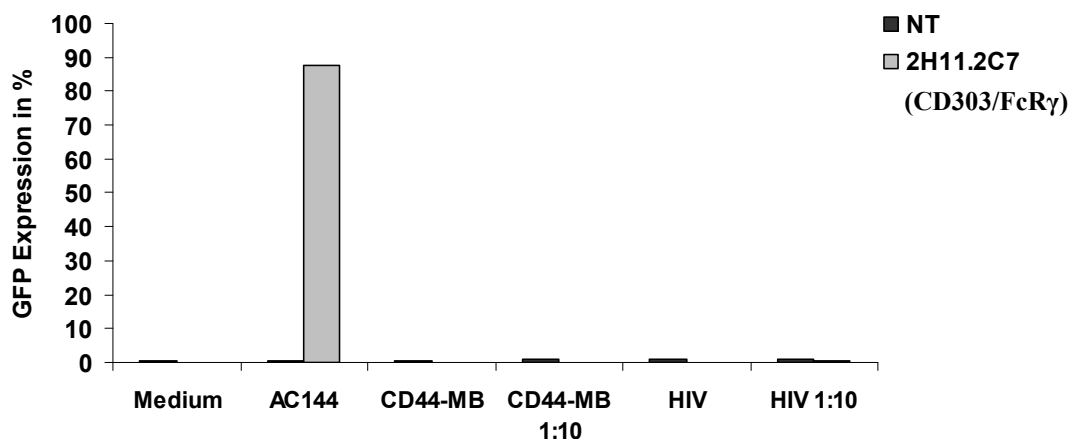


Abbildung 37. Kokultur des NFAT-GFP-Reporters mit HIV-1, welches in PBMC produziert wurde

2×10^5 bzw. 2×10^4 (1:10 Verdünnung) infektiöse HIV-1-Partikel, die mit Hilfe von CD44-MB aus Zellkulturüberständen mit PHA/Ionomycin stimulierter peripherer mononukleärer Zellen aufgereinigt wurden, wurden mit 1×10^5 A95-KK.NT- bzw. A95-KK.2H11.2C7-Zellen für ca. 45 h in Zellkulturplatten (96-Well, Rundboden) kultiviert. Zu Kontrollzwecken wurden die Reporterzellen mit 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ AC144, CD44-MB und einer 1:10 Verdünnung der CD44-MB kultiviert. Die Frequenz GFP-exprimierender Zellen ist angegeben in %. Dieses Experiment wurde mit Hilfe von Dr. I. Johnston (Miltenyi Biotec) durchgeführt.

Es stellte sich die Frage, ob das HIV-Protein gp120 durch den CD44-MB Aufreinigungsschritt eventuell maskiert und für CD303 unzugänglich gemacht wurde. Aus diesem Grund wurden Aldithriol-2 behandelte, inaktivierte HIV-1-Viruspartikel (Stamm: BAL), die in der Zelllinie SuPT1-CCR5 der Arbeitsgruppe von Dr. J. Lifson des *Frederick National Laboratory for Cancer Research*, Maryland, USA hergestellt wurden, im Kokulturansatz mit der A95-KK.2H11.2C7-Reporterzelle getestet. Als Negativkontrolle wurden Mikrovesikel der SuPT1-CCR5-Zelllinie in gleichen Konzentrationen eingesetzt. Zwei unterschiedliche Inkubationszeitpunkte wurden bestimmt: 19 h und 43 h. Aber auch dieser Ansatz führte zu keinem Signal in der Reporterzelllinie (Abb. 38).

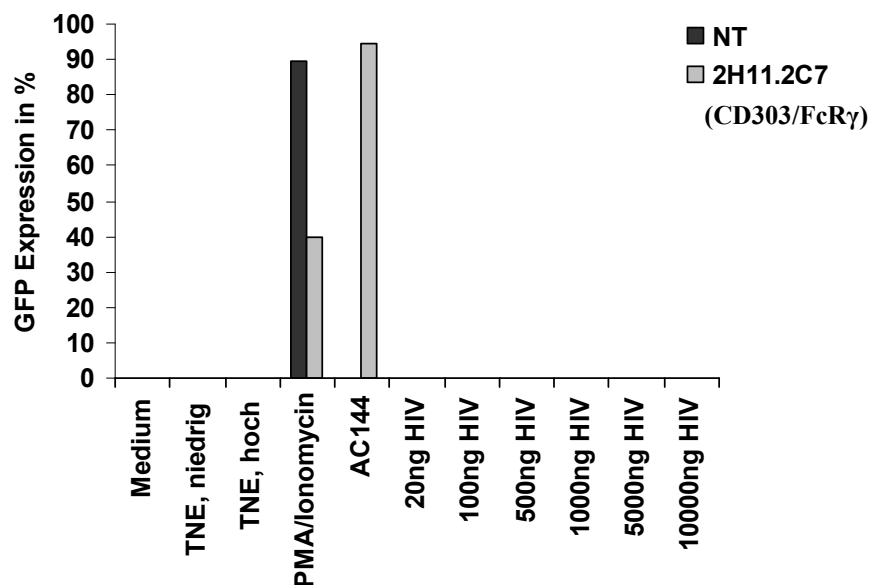


Abbildung 38. Kokultur des NFAT-GFP-Reporters mit HIV-1, welches in der SuPT1-CCR5-Zelllinie produziert wurde

Aufsteigende Mengen an Aldithriol-2 inaktivierten HIV-1-Partikel wurden mit 1×10^5 A95-KK.NT- bzw. A95-KK.2H11.2C7-Zellen für ca. 43 h in Zellkulturplatten (96-Well, Rundboden) kultiviert. Zu Kontrollzwecken wurden die Reporterzellen mit 5 ng/ml PMA und 1 µg/ml Ionomycin, 1 µg/ml AC144, einer niedrigen und einer hohen Konzentration des TNE-Puffers (korreliert mit dem Volumen, in dem 5000 ng bzw. 10000 ng HIV-1-Partikel enthalten sind) kultiviert. Die Frequenz GFP-exprimierender Zellen ist angegeben in %. Die Viruspartikel wurden durch die Arbeitsgruppe von Dr. J. Lifson bereit gestellt (vgl. Kapitel 2.1.7.2).

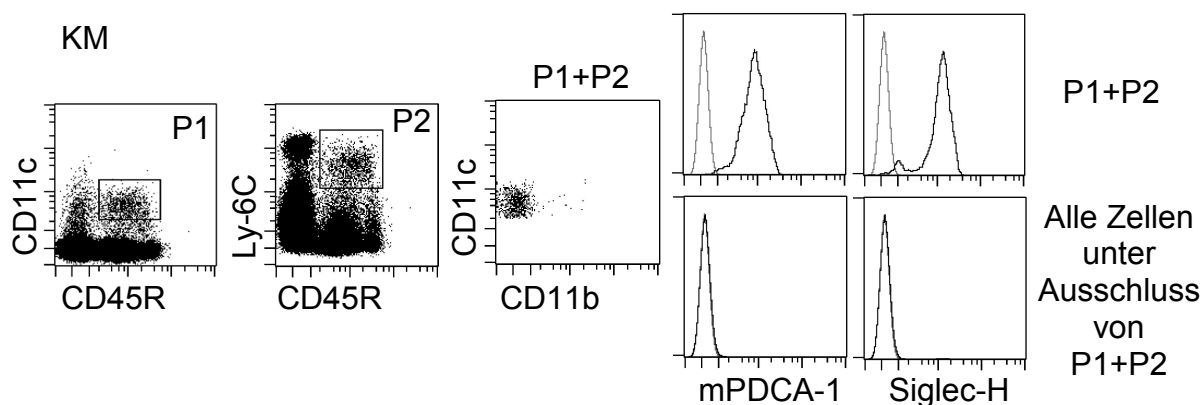
Schlussfolgernd lässt sich festhalten, dass ausgehend von den Kokulturexperimenten mit der A95-KK NFAT-GFP-Zelllinie, gp120 im Verbund von HIV-1 nicht als ein funktioneller Ligand von CD303 bestätigt werden konnte. Weiterhin blieben alle getesteten Zelllinien, weitere Pathogene wie Pilze und diverse Saccharide negativ für einen funktionellen CD303-Liganden.

3.8 Sca-1-Expression hängt von der Organverteilung und der genetischen Beschaffenheit des Mausstammes ab

Murine plasmazytoide dendritische Zellen (PDCs) erscheinen als eine homologe Population, die durch eine intermediäre (int.) Expression des DC-Markers CD11c, eine hohe Expression von Ly-6C und CD45R (B220), aber auch eine fehlende Expression von CD11b charakterisiert werden (Asselin-Paturel *et al.*, 2001). Darüber hinaus wurden im Jahre 2006 zwei neue Marker Siglec-H (Blasius *et al.*, 2006a) und mPDCA-1/BST2 (Blasius *et al.*, 2006b) beschrieben, die spezifisch nur auf Maus PDCs exprimiert werden.

Um den beschriebenen Phänotyp zu bestätigen, wurde die Expression von mPDCA-1 und Siglec-H auf PDCs von BALB/c-Mäusen sowohl im Knochenmark (Abb. 39A) als auch in der Milz (Abb. 39B) untersucht. Nur CD11c^{int}CD45R⁺Ly-6C⁺ Zellen exprimierten die PDC-Marker mPDCA-1 und Siglec-H (Abb. 39, P1+P2), wohingegen allen anderen Zellen keine Expression dieser Marker in den untersuchten Organen aufwiesen (Abb. 39, alle Zellen unter Ausschluss von P1+P2).

(A)



(B)

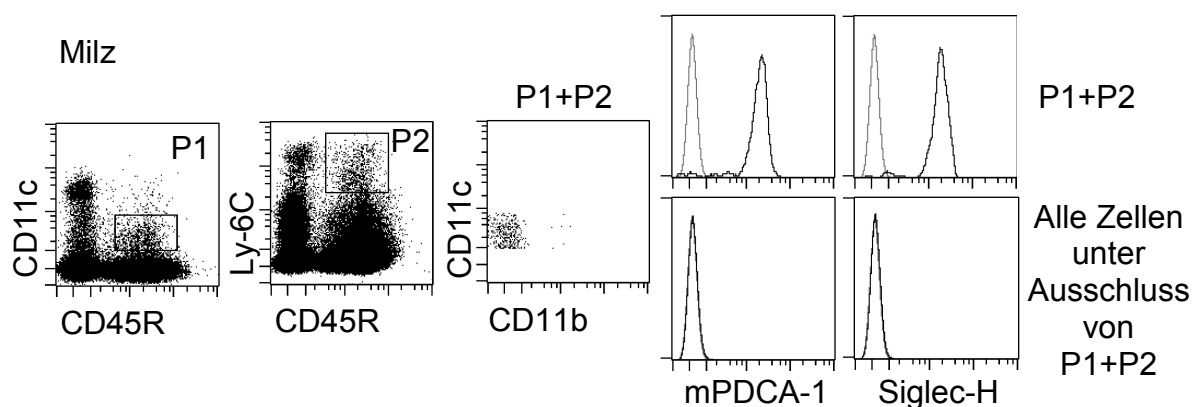
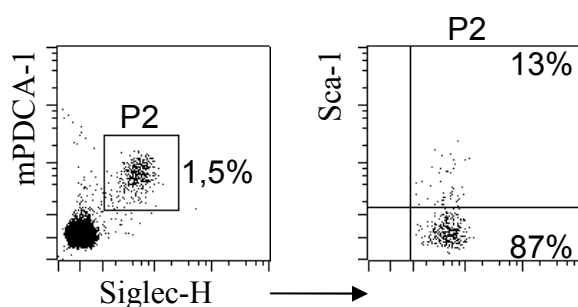


Abbildung 39. Charakterisierung von PDCs anhand von Oberflächenmarkern

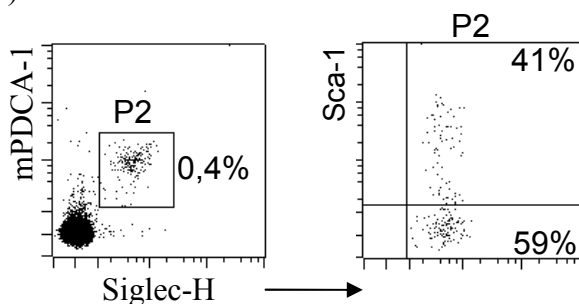
Zellen wurden aus dem Knochenmark (KM) (A) und der Milz (B) isoliert und mit Fluoreszenz-markierten Antikörpern gegen Maus Oberflächenmarker CD11c, CD45R, Ly-6C, CD11b, mPDCA-1 und Siglec-H gefärbt und durchflusszytometrisch am MACSQuant Analyzer untersucht (schwarze Linien). Als negative Kontrollen wurden Isotyp-spezifische Antikörperkonjugate eingesetzt (graue Linien).

Arbeiten von Dr. J. Fischer (Fischer, 2008) und S. Kurig (unveröffentlicht) zeigten, dass ein weiterer Marker Sca-1 (*stem cell antigen-1*, Ly-6A/E) heterogen auf verschiedenen Organen muriner PDCs exprimiert wird. Um die Expression von Sca-1 in PDCs aus unterschiedlichen lymphatischen Organen zu validieren, wurden Einzelzellpräparationen von Knochenmark (Abb. 40A), Milz (Abb. 40B), peripheren und mesenterischen Lymphknoten (Abb. 40C) aus BALB/c-Mäusen mit Antikörpern gegen Siglec-H, mPDCA-1 und Sca-1 gefärbt. Siglec-H⁺mPDCA-1⁺ PDCs (Abb. 40, P2) wurden auf den prozentualen Anteil von Sca-1⁺ Zellen untersucht. Den geringsten Anteil an Sca-1⁺ PDCs detektierte man im Knochenmark, wo etwa 10-20% der PDCs den Stammzellmarker Sca-1 exprimierten. In der Milz detektierte man ein ausgeglichenes Verhältnis an Sca-1⁺ und Sca-1⁻ PDCs. Die höchste Expression von Sca-1 wurde in PDCs aus den Lymphknoten beobachtet. Hier exprimierten ca. 70-85% der mPDCA-1⁺Siglec-H⁺ Zellen den Marker Sca-1. Diese Ergebnisse deckten sich mit den Daten von Dr. J. Fischer (Fischer, 2008) und S. Kurig (unveröffentlicht). Eine differentielle Expression von Sca-1 konnte man ebenso in PDCs, die aus Knochenmarkvorläufern *in vitro* mit Hilfe von Maus Flt3-Ligand (mFlt3-L) generiert wurden, detektieren (Abb. 45A, R2). Hier wurden nach 9 Tagen Kultur vergleichbare Frequenzen wie in der Milz erreicht.

(A) KM



(B) Milz



(C) LK

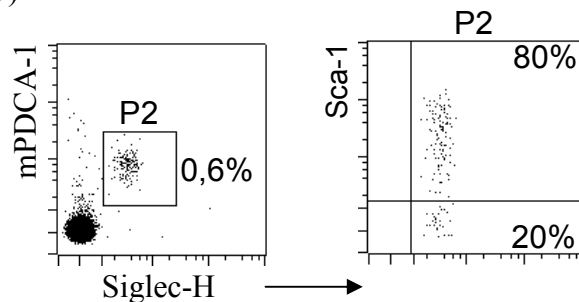


Abbildung 40. Heterogene Expression von Sca-1 in PDCs aus verschiedenen lymphatischen Organen

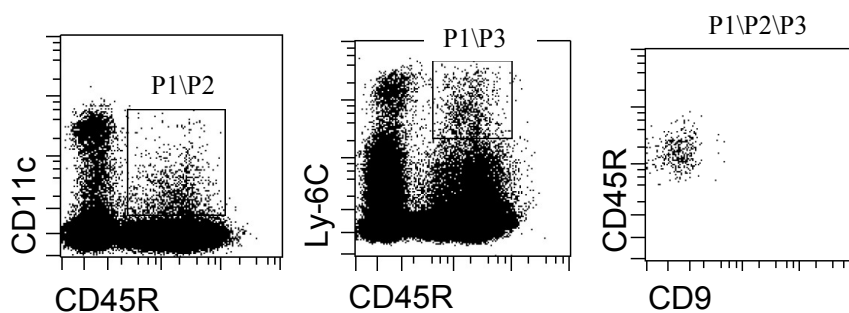
Einzelzellsuspensionen aus Knochenmark (KM) (A), Milz (B) und Lymphknoten (LK) (C) einer BALB/c-Maus wurden mit Antikörpern, die gegen mPDCA-1, Siglec-H und Sca-1 gerichtet sind, oder mit entsprechenden Isotypkontrollen gefärbt. mPDCA-1⁺Siglec-H⁺ PDCs (P2) wurden auf die Expression von Sca-1 untersucht. Gezeigt ist ein repräsentatives Färbebeispiel aus mind. drei unabhängigen Experimenten.

Neben einer Organ-spezifischen Variation der Sca-1-Expression konnte auch eine Abhängigkeit vom genetischen Hintergrund der Mausstämmen bestätigt werden. Sca-1 wird in zwei verschiedenen Allelen (Ly-6^a und Ly-6^b-Lokus) exprimiert. So zeigten nicht aktivierte Milzzellen aus Mäusen eines Ly-6^b Haplotyps (AKR/J, C57BL/6, Sv129) durchschnittlich eine 2-fach höhere Frequenz an Sca-1-exprimierenden Zellen (75-90%) verglichen mit PDCs aus Mausstämmen des Ly-6^a Haplotyps (BALB/c, FVB) (45-65%), wobei in DBA/1-Mäusen (Ly-6^a-Haplotyp) die geringste Frequenz an Sca-1-exprimierenden Zellen (ca. 20%) zu detektieren war (Fischer, 2008). Diese Ergebnisse bestätigten bereits beschriebene Erkenntnisse von der Allel-abhängigen Sca-1-Expression (Malek *et al.*, 1986; Ortega *et al.*, 1986; Codias *et al.*, 1989; Yang *et al.*, 2005; Spangrude und Brooks, 1993).

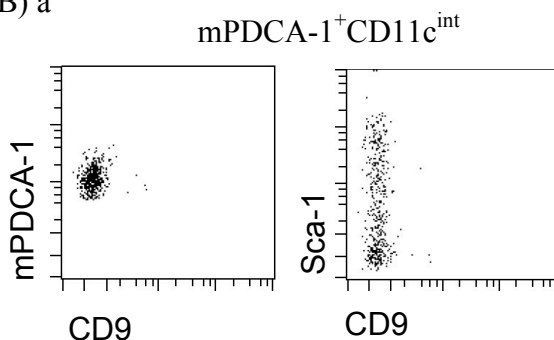
Björck und Kollegen charakterisierten im Jahre 2011 zwei funktionell unterschiedliche PDC-Subpopulationen aufgrund der CD9-Expression (Björck *et al.*, 2011). CD9-exprimierende PDCs wurden dabei im Knochenmark lokalisiert und als die Hauptproduzenten von IFN- α nach spezifischer Stimulation beschrieben, während CD9⁻ PDCs primär in der Peripherie zu

finden waren und tolerogene Eigenschaften aufwiesen (Björck *et al.*, 2011). Um zu überprüfen, ob die CD9-Expression mit der Sca-1-Expression anti-korreliert und diese Marker gleiche PDC-Subpopulationen beschreiben, wurden Zellen aus dem Knochenmark und der Milz isoliert und mit Antikörpern gegen CD11c, CD45R, Ly-6C, mPDCA-1, Sca-1 und CD9 gefärbt. Beispielhaft sind die Färbeergebnisse der Milzzellen in Abb. 41 dargestellt. Sowohl in der Milz als auch im Knochenmark wurde die Expression von CD9 auf den allgemein definierten $CD11c^{int}CD45R^{+}Ly-6C^{+}$ PDCs nicht beobachtet (Abb. 41A). Weiterhin war keine CD9-Färbung auf $mPDCA-1^{+}CD11c^{int}$ Milzzellen und somit keine Korrelation mit der Sca-1-Expression zu detektieren (Abb. 41Ba). Bei näherer Betrachtung aller mPDCA-1-einzelpositiven Milzzellen konnte man eine minimale Koexpression mit CD9 von ca. 0,1% detektieren (Abb. 41Bb). Ebenso zeigte eine weitere Untersuchung aller Siglec-H⁺ Zellen aus der Milz und dem Knochenmark von C57BL/6-Mäusen eine vergleichbare Frequenz von 0,1% an Siglec-H- und CD9-exprimierenden PDCs. Innerhalb dieser Population exprimierten ca. 70% der Zellen den Marker Sca-1 unabhängig vom Organ (Daten nicht gezeigt).

(A)



(B) a



b

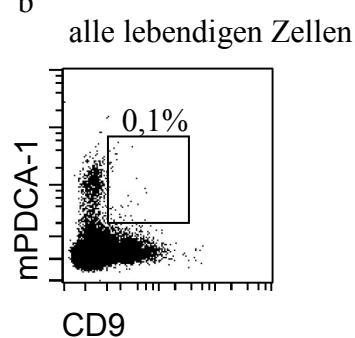


Abbildung 41. CD9- und Sca-1-Expression korrelieren nicht miteinander

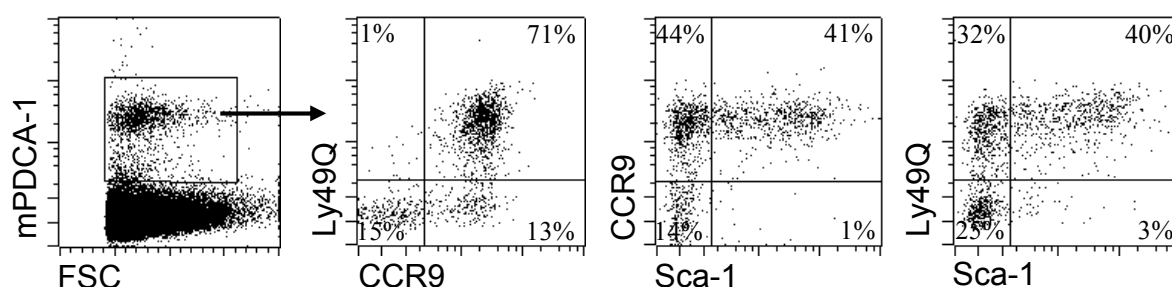
(A) Die Expression von CD11c, CD45R, Ly-6C und CD9 wurde in Einzelzellsuspensionen der Milz von BALB/c-Mäusen mit entsprechenden Antikörpern getestet. $CD11c^{+}CD45R^{+}Ly-6C^{+}$ PDCs (P1\2\3) wurden im Hinblick auf die CD9-Expression näher untersucht.

(B) Die in A beschriebenen $mPDCA-1^{+}CD11c^{int}$ PDCs wurden auf eine Koexpression der Marker CD9 und Sca-1 analysiert (a). Ebenso wurde eine Koexpression von mPDCA-1 und CD9 aller lebendigen Milzzellen getestet (b).

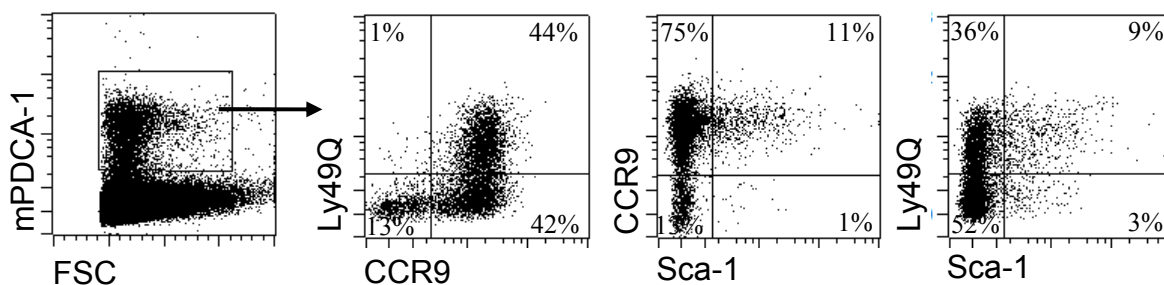
Weitere Studien identifizierten zwei andere Marker, die zur Charakterisierung von murinen PDC-Subpopulationen eingesetzt wurden: Ly49Q und CCR9 (CD199) (Omatsu *et al.*, 2005; Toyama-Sorimachi *et al.*, 2005; Kamogawa-Schifter *et al.*, 2005; Hadeiba *et al.*, 2008; Segura *et al.*, 2009; Schlitzer *et al.*, 2011). Wohingegen im Knochenmark ein vergleichbarer Anteil an Ly49Q⁻ und Ly49Q⁺ PDCs lokalisiert wird, detektiert man in der Peripherie fast ausschließlich Ly49Q-exprimierende PDCs (Kamogawa-Schifter *et al.*, 2005). Ly49Q⁻ PDCs repräsentieren die Vorläuferzellen von Ly49Q⁺ PDCs (Omatsu *et al.*, 2005). CCR9⁻ PDCs bilden einen Anteil von bis zu 30% im Knochenmark und differenzieren zu CCR9⁺ PDCs, die fast die gesamte PDC-Population in peripheren Organen bilden (Schlitzer *et al.*, 2011; Hadeiba *et al.*, 2008). Unter bestimmten Bedingungen können sich CCR9⁻ Vorläuferzellen auch in cDCs entwickeln (Schlitzer *et al.*, 2011).

Um zu überprüfen, ob die Expression dieser Marker mit der Sca-1-Expression korreliert, wurden Zellen aus der Milz und dem Knochenmark von BALB/c-Mäusen isoliert und mit Antikörpern gegen mPDCA-1, Ly49Q, CCR9 und Sca-1 gefärbt. Anhand Abb. 42A erkennt man, dass ein hoher Anteil an mPDCA-1⁺ PDCs in der Milz sowohl Ly49Q als auch CCR9 exprimierte (71%), wobei der Anteil aller CCR9⁺ PDCs bei ca. 85% lag. Weiterhin zeigte eine Analyse aller CCR9⁺ oder Ly49Q⁺ mPDCA-1⁺ PDCs ein ausgewogenes Verhältnis an Sca-1⁺ und Sca-1⁻ PDCs. Es konnten wenige CCR9⁻Ly49Q⁻Sca-1⁻ PDCs detektiert werden. Im Knochenmark, wo ca. 80% der Zellen durch ein Fehlen der Sca-1-Expression charakterisiert wurden (Abb. 40A), minimierte sich der Anteil an Ly49Q-exprimierenden mPDCA-1⁺ PDCs auf 45%, wobei die Frequenz an CCR9⁺ mPDCA-1⁺ PDCs weiterhin bei 86% lag (Abb. 42B). Verglichen mit der Frequenz an Sca-1-exprimierenden PDCs konnte eine Tendenz zur Koregulation der Expression der Marker festgestellt werden, wobei eine stärkere Koregulation der Expression von Ly49Q und CCR9 verglichen mit der Expression von Sca-1 und Ly49Q bzw. Sca-1 und CCR9 zu beobachten war.

(A) Milz



(B) Knochenmark

**Abbildung 42. Ly49Q, CCR9 und Sca-1 definieren unterschiedliche PDC-Subpopulationen**

(A) Die Einzelzellsuspension der Milz wurde mit Antikörpern gegen mPDCA-1, Ly49Q, CCR9 und Sca-1 gefärbt. mPDCA-1⁺ PDCs wurden auf eine Koexpression von Ly49Q und CCR9, CCR9 und Sca-1 bzw. Ly49Q und Sca-1 untersucht.

(B) Isolierte Zellen aus dem Knochenmark einer BALB/c-Maus wurden wie in (A) beschrieben durchflusszytometrisch analysiert.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass durch die Expression der Marker CCR9, Ly49Q und Sca-1 unterschiedliche PDC-Subpopulationen definiert werden können. Ausgehend vom Expressionsprofil der PDCs unterschiedlicher Organe und der damit verbundenen Hochregulation dieser Marker im Laufe der Entwicklung kann man die Hypothese aufstellen, dass CCR9 der früheste Marker ist, gefolgt von Ly49Q und zuletzt von Sca-1.

3.9 Sca-1⁻ PDCs repräsentieren ein frühes Entwicklungsstadium von PDCs

Wie zuvor gezeigt, ist die Mehrheit der PDCs im Knochenmark durch ein Fehlen der Sca-1-Expression charakterisiert, wohingegen ein umgekehrtes Verhältnis der Sca-1-Expression in Lymphknoten beobachtet werden konnte. Bereits Fischer und Kurig vermuteten, dass Sca-1⁻ PDCs die Vorläuferpopulation von Sca-1⁺ PDCs bilden, weil sie die Vorläufermarker CD34 und CD117 (Onkoprotein c-Kit) in den untersuchten Knochenmark-PDCs exprimierten (Fischer, 2008; Kurig, unveröffentlicht). Eine Analyse der PDCs aus dem Knochenmark (Abb. 43A) und der Milz (Abb. 43B) einer BALB/c-Maus mit Antikörpern gegen MHC-Klasse-II-Moleküle und Aktivierungsmarker CD80, CD86 und CD40 bestätigten die Hypothese. Verglichen mit Sca-1⁻ PDCs zeigten Sca-1⁺ PDCs sowohl im Knochenmark als auch in der Milz eine höhere Expression von MHC-Klasse II-Molekülen, die auf ein späteres Entwicklungsstadium der PDCs hindeuteten. Diese Expression war unabhängig von der Expression der kostimulatorischen Moleküle CD80, CD86 und CD40, die in beiden Subpopulationen

vergleichbar gering war. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass die Regulation der Sca-1-Expression in den jeweiligen Organen von spezifischen lokalen Faktoren erfolgt und nicht mit der Aktivierung der Zellen zusammenhängt.

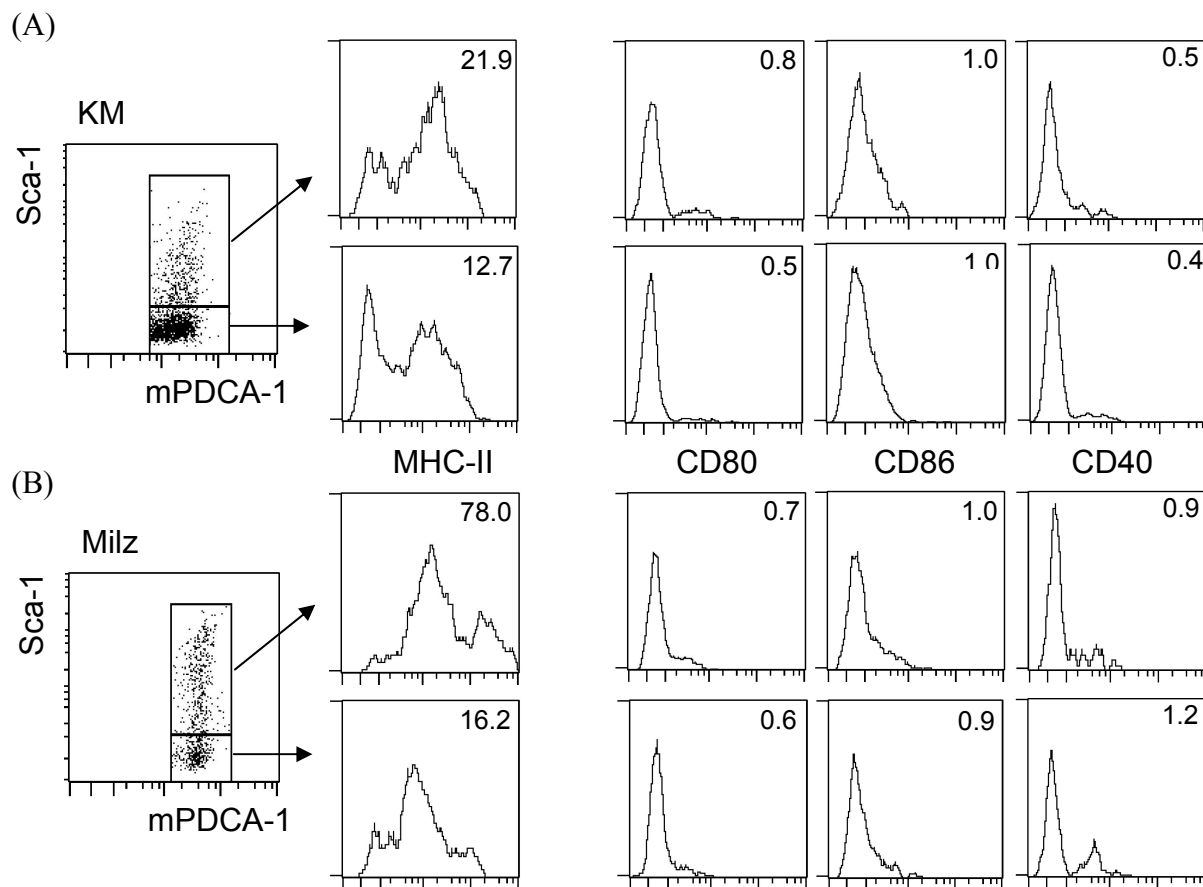


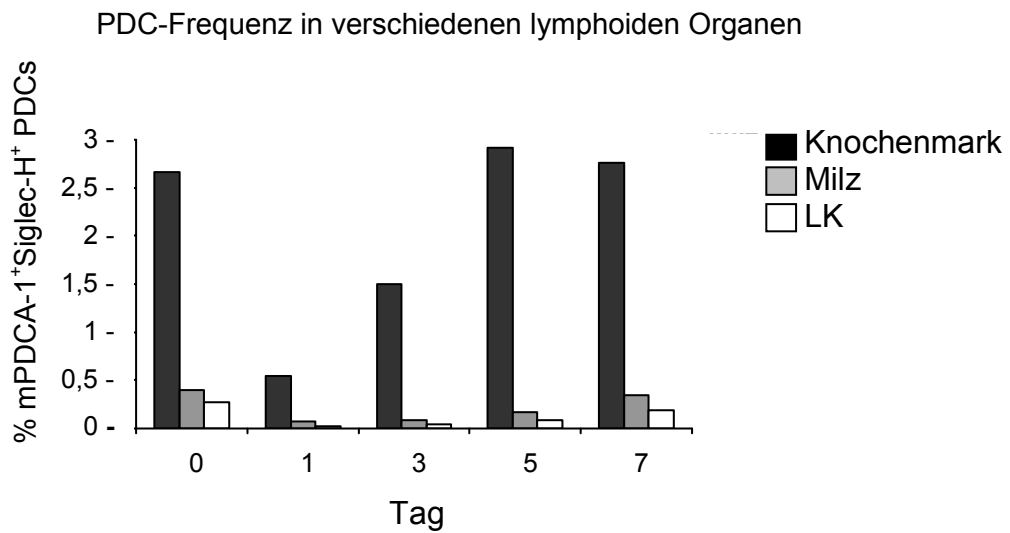
Abbildung 43. Sca-1⁻ PDCs erscheinen früh während der PDC-Entwicklung

Sca-1⁺ und Sca-1⁻ mPDCA-1⁺ PDCs, die aus dem Knochenmark (KM) (A) bzw. der Milz (B) einer BALB/c-Maus isoliert und aufgrund der Sca-1- und mPDCA-1-Expression definiert wurden, wurden weiterhin auf die Expression von MHC-Klasse-II-Molekülen und kostimulatorischen Markern CD80, CD86 und CD40 untersucht. Die durchschnittliche Fluoreszenzintensität ist angegeben.

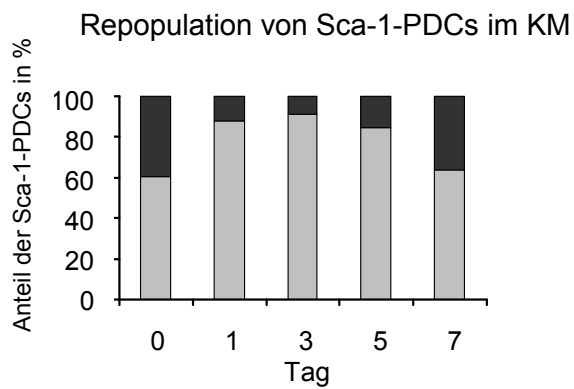
Um die Regulation der Sca-1-Expression während der Entwicklung zu verstehen, wurde ein CD303-DTR transgenes Mausmodell, welches von der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. M. Colonna, Washington Universität, St. Louis, USA, zur Verfügung gestellt wurde, hinzugezogen. In dieser Maus können PDCs spezifisch und systemisch in allen Organen durch die Administration von Diphtherietoxin (DT) nach Bindung des Diphtherietoxin-Rezeptors (DTR), der unter der Kontrolle des humanen PDC-spezifischen CD303-Promoters steht, depletiert werden (Swiecki *et al.*, 2010). Aufgrund einer hohen Konservierung des PDC-spezifischen Transkriptionsfaktors E2-2 zwischen den Spezies bindet der murine Transkrip-

tionsfaktor E2-2 an den humanen CD303-Promoter und initiiert die Expression von DTR in murinen PDCs (Swiecki *et al.*, 2010). Die Zugabe des Exotoxins DT führt nach Bindung an DTR zu einer Inhibition der Translation während der Proteinbiosynthese und schließlich zum programmierten Zelltod. Dadurch erfolgt eine spezifische Depletion von PDCs in der gesamten Maus. CD303-DTR transgene Mäuse wurden mit 5 ng DT pro g Körpergewicht intraperitoneal gespritzt. PDCs wurden nach der Injektion an Tag 0 jeden zweiten Tag im Hinblick auf die Repopulation im Knochenmark, in der Milz und den Lymphknoten innerhalb einer Woche getestet. Einzelzellpräparationen dieser Organe wurden mit Antikörpern gegen Siglec-H, mPDCA-1 und Sca-1 gefärbt. Während nahezu alle PDCs in der Milz und den Lymphknoten depletiert werden konnten, wurden 20% der PDCs im Knochenmark, dem blutbildenden Organ, 24 h nach DT-Injektion beobachtet. Die PDC-Frequenz erhöhte sich in den darauf folgenden Tagen und erreichte Ursprungsfrequenzen im Knochenmark an Tag 5 und in der Milz und den Lymphknoten an Tag 7 (Abb. 44A). Die Analyse der Sca-1-Expression in den neu entwickelten PDCs ergab, dass sich der Anteil der Sca-1⁻ PDCs in allen untersuchten Organen (Knochenmark, Milz und Lymphknoten) stark im Vergleich zu den Ausgangsfrequenzen erhöhte. Die Frequenz der Sca-1⁻ PDCs 24 h nach DT-Administration stieg im Knochenmark von 60% auf 90% (Abb. 44Ba) und in der Milz (Abb. 44Bc) und den Lymphknoten (Abb. 44Bd) von etwa 25-30% auf ca. 70%. Während der nächsten Tage erhöhte sich der Anteil an Sca-1-exprimierenden PDCs und erreichte an Tag 7 die ursprüngliche Organ-spezifische Verteilung. Diese Ergebnisse verdeutlichen, dass während der PDC-Entwicklung zuerst die Sca-1⁻ PDC-Subpopulation erscheint und die Expression von Sca-1 durch spezifische Faktoren der lokalen Nische reguliert wird. Adoptive Transferexperimente von Sca-1⁻ PDCs in syngene Mäuse belegten darüber hinaus, dass Sca-1⁻ PDCs einen direkten Vorläufer der Sca-1⁺ PDCs bilden (Fischer, 2008; Kurig, unveröffentlicht). Eine weitere durchflusszytometrische Analyse der neu gebildeten PDC-Population ergab, dass Sca-1⁻ PDCs verglichen mit Sca-1⁺ PDCs eine größere proliferative Kapazität aufgrund einer stärkeren Expression des Proliferationsmarkers Ki67 besitzen (Abb. 44Bb). Die Sca-1-Expression kann somit als ein Indikator für den Entwicklungs- und Reifestatus der Zellen dienen.

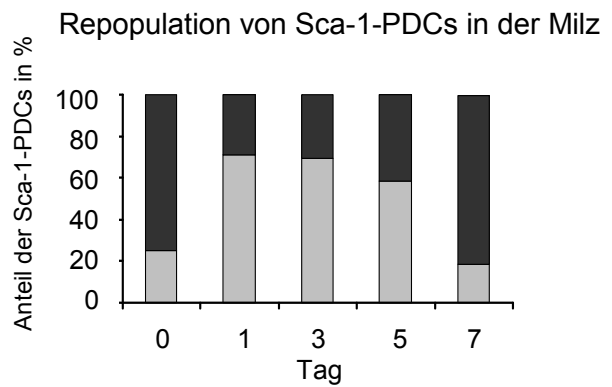
(A)



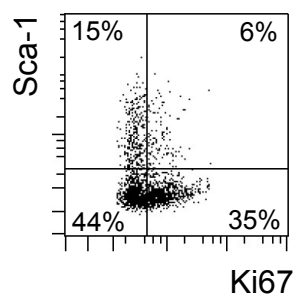
(B) (a)



(c)



(b)



(d)

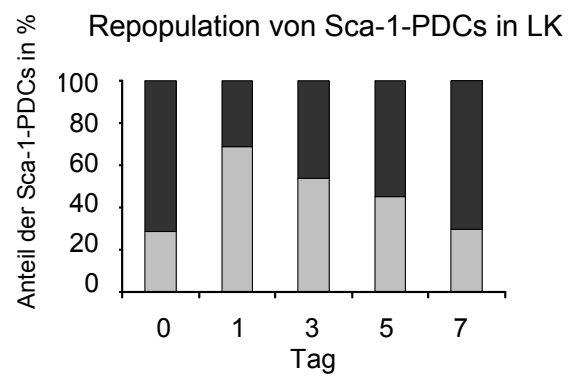


Abbildung 44. Sca-1⁺ PDCs bilden die Vorläuferpopulation

(A) CD303-DTR transgenen Mäusen wurde an Tag 0 Diphtherietoxin (5 ng DT pro g Körpergewicht) i.p. gespritzt. Innerhalb der nächsten 7 Tage wurde die Gesamtzellpopulation aus dem Knochenmark, der Milz und den Lymphknoten isoliert. Die Frequenz der neu gebildeten mPDCA-1⁺Siglec-H⁺ PDCs wurde bestimmt und ist in % angegeben.

(B) Die in A gemessenen PDCs wurden auf die Expression von Sca-1 untersucht. Die Balkendiagramme zeigen den Anteil von Sca-1⁺ PDCs (schwarz) und Sca-1⁻ PDCs (grau) innerhalb der gesamten PDC-Population während der Repopulationsperiode im Knochenmark (KM) (a), in der Milz (c) und den Lymphknoten (LK) (d) in %. Die Expression von Sca-1 und des intrazellulären Proliferationsmarkers Ki67 wurde an Tag 5 der Repopulation in Siglec-H⁺ PDCs bestimmt (b).

3.10 Sca-1 wird nach einer TLR-abhängigen Stimulation hochreguliert

Um zu überprüfen, ob die Expression von Sca-1 auch nach TLR-abhängigen Aktivierung der Zellen hochreguliert werden kann, wurden PDCs *in vitro* mit mFlt3-L generiert. Nach einer 9-tägigen Kultur wurden PDCs zuerst magnetisch angereichert (Abb. 45A, R2) und anschließend durchflusszytometrisch anhand der charakteristischen Expression von mPDCA-1 und Sca-1 in die Sca-1⁺ (Abb. 45A, R4) und die Sca-1⁻ (Abb. 45A, R3) PDC-Subpopulation sortiert (Reinheiten $\geq 96\%$). Diese Zellen wurden anschließend mit 5 $\mu\text{g/ml}$ CpG-A ODN 2216 (endosomaler TLR9-Ligand), CpG-B ODN 1668 (lysosomaler TLR9-Ligand) und R-848 (TLR7-Ligand) für 24 h stimuliert. Eine TLR7/9-abhängige Aktivierung der Zellen führte zu einer Hochregulation der Sca-1-Expression. Neben Sca-1⁻ PDCs regulierten auch Sca-1⁺ PDCs die Expression von Sca-1 hoch, was an einer Steigerung der durchschnittlichen Fluoreszenzintensität vor allem nach CpG-B und R-848-Stimulation der Zellen erkennbar war (Abb. 45A, R4). Gleiche Ergebnisse konnten zuvor bereits *in vivo* bestätigt werden (Fischer, 2008; Kurig, unveröffentlicht).

Einige Studien haben gezeigt, dass die Hochregulierung von Ly6-Molekülen in Lymphozyten durch Interferon-alpha (IFN- α), Interferon-beta (IFN- β) und Interferon-gamma (IFN- γ) induziert werden kann (Dumont und Coker, 1986; Dumont *et al.*, 1987; Snapper *et al.*, 1991). Um zu testen, ob das murine IFN- α (mIFN- α) ein wirksamer Aktivator der Sca-1-Expression in PDCs ist, wurden *in vitro* generierte und sortierte Sca-1⁺ und Sca-1⁻ PDCs in Anwesenheit von rekombinaten mIFN- α (rmIFN- α) für 24 h kultiviert. In einem TLR9-unabhängigen Mechanismus führte bereits eine Konzentration von 100 U/ml des rmIFN- α zu einer starken Hochregulation von Sca-1 (Abb. 45B).

Da PDCs schon seit langem als die Hauptproduzenten von Typ I IFN nach mikrobieller TLR7/9-Aktivierung bekannt sind (Sparwasser *et al.*, 1998; Jakob *et al.*, 1998; Krug *et al.*, 2001a), sollte als nächstes überprüft werden, ob die Neutralisation von IFN- α nach einer

TLR9-vermittelten CpG-A-Stimulation zur einer Inhibition der Sca-1-Hochregulation führt. *In vitro* generierte und sortierte Sca-1⁺ und Sca-1⁻ PDCs wurden in Anwesenheit von neutralisierenden Antikörpern gegen IFN- α (RMMA-1 und F18) bzw. gegen den IFN- α/β Rezeptor 1 (IFN- α/β R1) mit 5 μ g/ml CpG-A ODN 2216 für 24 h kultiviert. Eine Kombination aus den monoklonalen Antikörpern F18 und RMMA-1 konnte die Hochregulation von Sca-1 nicht inhibieren. Der Grund hierfür könnte in der nicht effizienten Neutralisation aller Typ I IFN liegen, da auch IFN- β , das die Hochregulation von Sca-1 induzieren kann, zu den frühen IFN-Genen gehört, die nach TLR9-Stimulation aktiviert werden und in Zellkulturüberständen des Ansatzes detektiert werden konnte (Daten nicht gezeigt). Demzufolge führte eine Neutralisation des IFN- α/β R1, wodurch die positive Rückkopplung zur Produktion weiterer IFN inhibiert wird, zu einer vollständigen Inhibition der Sca-1-Hochregulation in einer konzentrationsabhängigen Art und Weise (Abb. 45B).

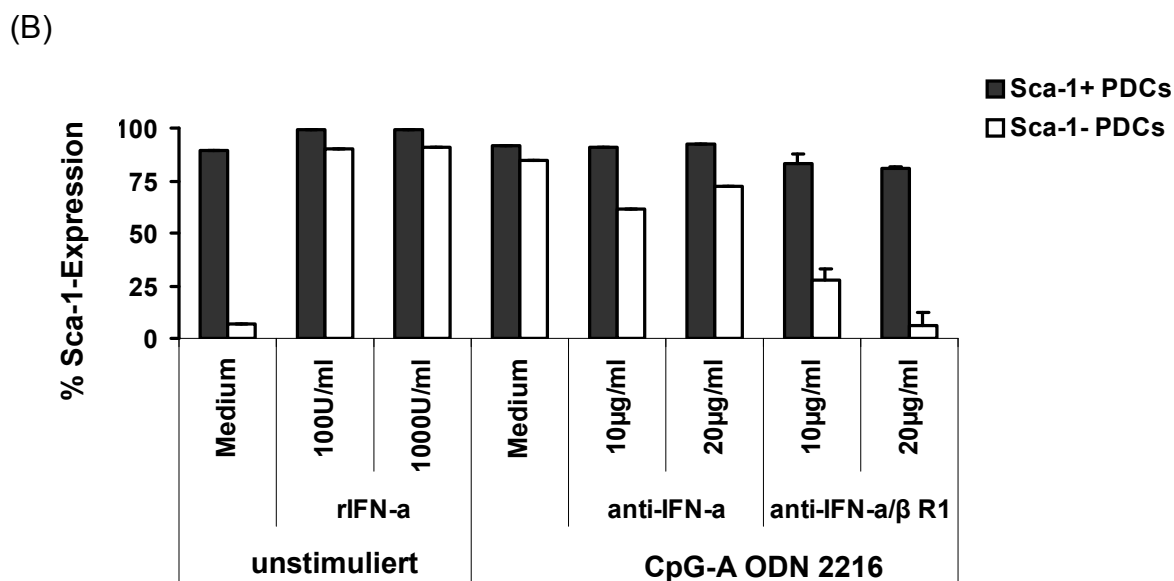
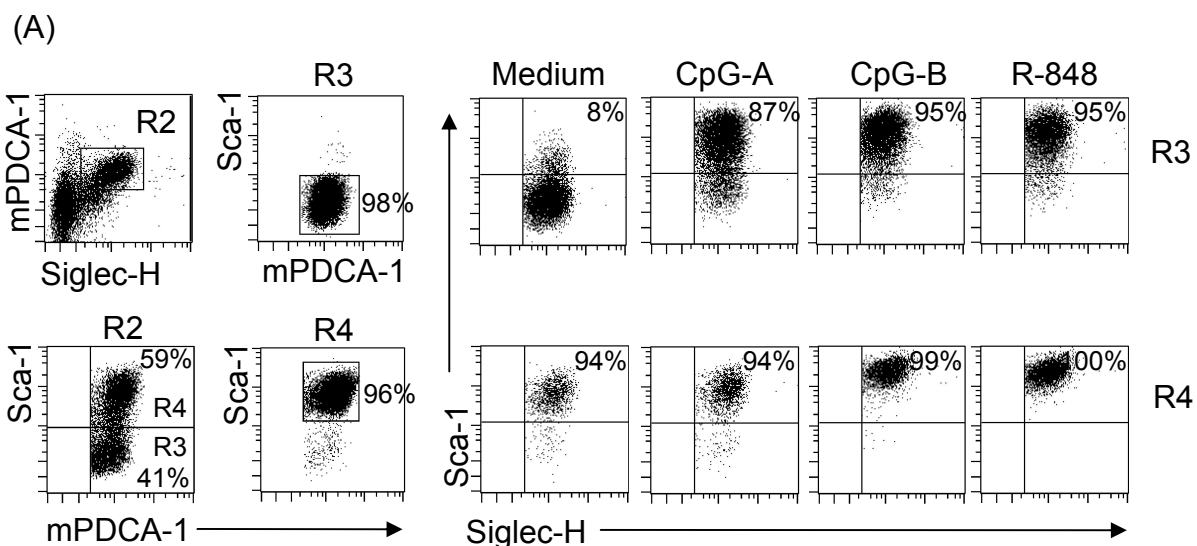


Abbildung 45. Sca-1-Expression kann durch eine TLR7/9-abhängige Stimulation und durch rIFN- α hochreguliert werden

(A) *In vitro* generierte PDCs wurden mit Hilfe der MACS-Technologie angereichert (R2) und nachfolgend aufgrund der Sca-1-Expression in Sca-1^mPDCA-1⁺ (R3) bzw. Sca-1⁺mPDCA-1⁺ (R4) PDCs durchflusszytometrisch sortiert (Reinheit $\geq 96\%$). Beide Subpopulationen wurden für 24 h mit 5 $\mu\text{g/ml}$ CpG-A (ODN 2216), CpG-B (ODN 1668) und R-848 stimuliert und anschließend auf die Expression von Siglec-H und Sca-1 untersucht. Als negative Kontrolle wurden unbehandelte Zellen hinzugezogen.

(B) Zellen wurden wie in A beschrieben aufgearbeitet. Sca-1⁺ PDCs (schwarze Balken) und Sca-1⁻ PDCs (weiße Balken) wurden mit 100 U/ml bzw. 1000 U/ml mrIFN- α kultiviert. Zum Vergleich wurden diese Zellen mit 5 $\mu\text{g/ml}$ CpG-A in Anwesenheit von neutralisierenden Antikörpern gegen IFN- α (Klon F18 und RMMA-1) bzw. IFN- α/β Rezeptor 1 ($n = 2$) stimuliert. Der Anteil Sca-1-exprimierender Zellen ist angegeben in %.

3.11 Sca-1-PDCs zeigen funktionelle Unterschiede im endosomalen TLR9-Signalweg

Im Zusammenhang mit der Charakterisierung verschiedener PDC-Subpopulationen aufgrund der Expression bestimmter Marker konnten bereits unterschiedliche Funktionen dieser Zellen beschrieben werden. So bestand der Verdacht, dass es auch funktionelle Unterschiede zwischen der Sca-1⁺ und der Sca-1⁻ Subpopulation gibt. Fischer und Kurig beobachteten eine Korrelation zwischen der Anzahl an IFN- α -produzierenden PDCs und der sezernierten Gesamtmenge an IFN- α in Zellkulturüberständen der Organ-spezifischen PDCs nach endosomaler TLR9-Stimulation mit CpG-A (Fischer, 2008; Kurig, unveröffentlicht). Knochenmark-PDCs produzierten dabei das meiste IFN- α , während Lymphknoten-PDCs um Vielfaches weniger IFN- α sezernierten. Es wurde eine Hypothese aufgestellt, dass die Organ-spezifische Variation der IFN- α -Produktion mit dem Anteil an Sca-1⁻ PDCs im jeweiligen Organ zusammenhängt und dass diese Population im Gegensatz zu Sca-1⁺ PDCs eine höhere Kapazität zur IFN- α -Produktion besitzt (Fischer, 2008; Kurig, unveröffentlicht). Um diese Hypothese zu überprüfen, wurden sowohl *in vitro* generierte PDCs als auch *ex vivo* PDCs aus der Milz in die Sca-1⁺ und Sca-1⁻ Subpopulation sortiert und über Nacht mit CpG-A ODN 2216 stimuliert. Die produzierte IFN- α -Menge wurde in einem spezifischen IFN- α -ELISA ermittelt. Eine differentielle IFN- α -Produktion zwischen den beiden Subpopulationen konnte detektiert und somit bestätigt werden. Sca-1⁻ PDCs aus der Milz produzierten 4-fach mehr IFN- α verglichen mit Sca-1⁺ PDCs (Abb. 46A). In *in vitro* generierten PDCs detektierte man sogar einen Unterschied von Faktor 12 (Abb. 46B).

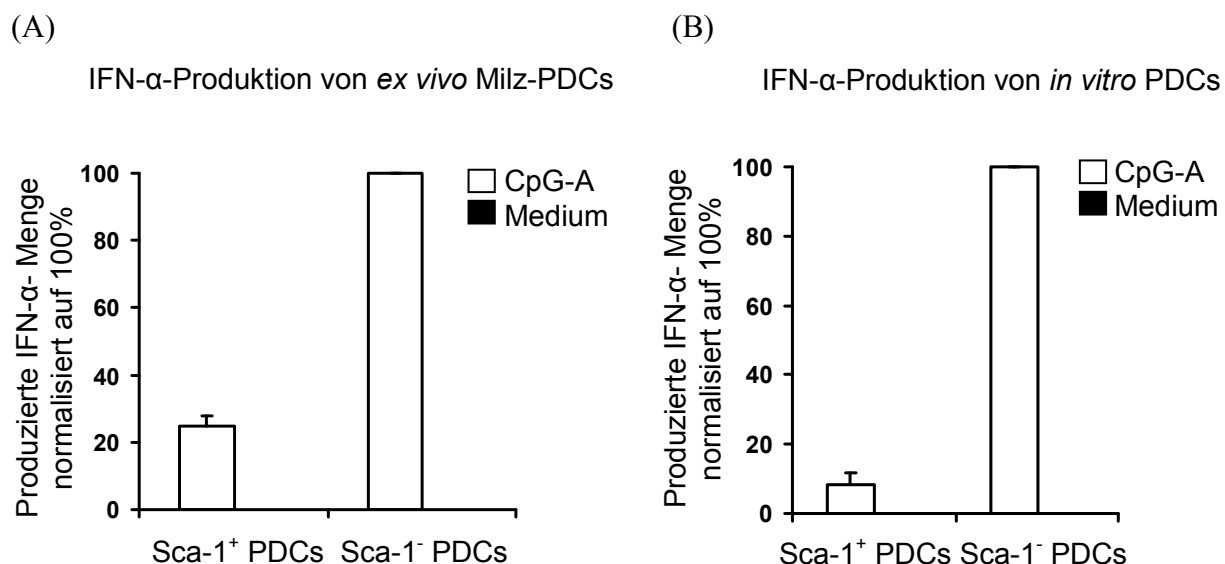


Abbildung 46. Sca-1⁻ PDCs haben eine höhere Kapazität zur IFN-α-Produktion nach TLR9-spezifischer Stimulation

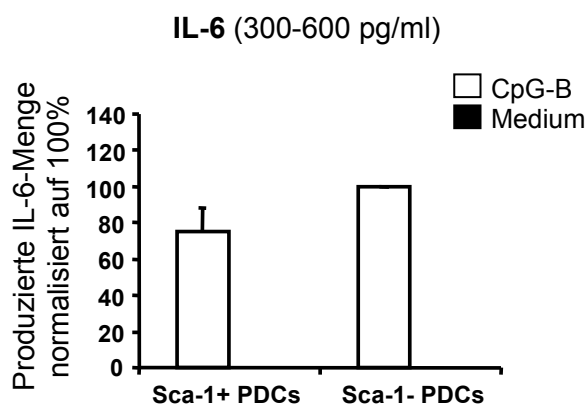
(A) PDCs aus der Milz wurden isoliert und unter der Anwendung der MACS und FACS-Technologie in die Sca-1⁺mPDCA-1⁺ und Sca-1⁻mPDCA-1⁺ Subpopulation sortiert. Die Zellen wurden für 17 h mit 5 µg/ml CpG-A stimuliert. IFN-α-Sekretion wurde mit Hilfe eines spezifischen ELISA-Experiments ermittelt. Die produzierte Menge wurde pro lebendige Zelle berechnet und auf Sca-1⁻ PDCs normalisiert (als 100% gesetzt) (n = 2).

(B) *In vitro* generierte PDCs wurden wie in A angegeben aufgearbeitet und behandelt. Die produzierte IFN-α-Menge pro lebendige Zelle wurde wie in A bestimmt und pro Sca-1⁻ PDC normalisiert (n = 2).

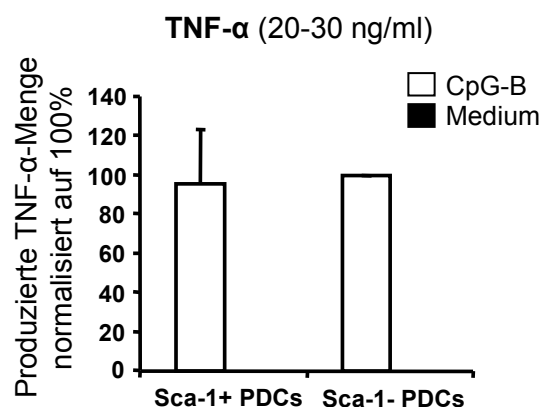
Welche molekulare Mechanismen können die funktionellen Unterschiede zwischen Sca-1⁺ und Sca-1⁻ PDCs erklären? Welche Rolle spielt der TLR9-Signalweg in den beiden Subpopulationen? Um diese Fragen zu beantworten, sollte die räumlich-zeitliche Aktivierung von TLR9 mit Hilfe von CpG-B überprüft werden. Während CpG-A spezifisch über den endosomalen TLR9-Signalweg in einem IRF-7-abhängigen Mechanismus zur Aktivierung von Typ I IFN führt, bindet CpG-B an das lysosomale TLR9 und aktiviert die Expression von proinflammatorischen Zytokinen und die Reifung von PDCs in einem NF-κB/IRF-5-abhängigen Signalweg gemäß dem räumlich-zeitlichen Modell nach Honda (Honda *et al.*, 2005a; Guiducci *et al.*, 2006; Krieg, 2002). Um die Produktion von proinflammatorischen Zytokinen nach lysosomaler TLR9-Stimulation in Sca-1⁺ und Sca-1⁻ PDCs zu vergleichen, wurden sortierte Sca-1⁺ und Sca-1⁻ PDCs aus der Milz von BALB/c-Mäusen über Nacht mit 5 µg/ml CpG-B ODN 1886 stimuliert. Die Menge an sezernierten Zytokinen wurde mittels eines *Cytometric Bead Arrays* (CBA) bzw. eines spezifischen ELISAs detektiert. Es konnten hohe Mengen an TNF-α (20-30 ng/ml), mäßige Mengen an IL-6 (300-600 pg/ml) und IL12-p70

(200-300 pg/ml) und geringe Spuren an IFN- γ (6-8 pg/ml) in Zellkulturüberständen gemessen werden. Zur besseren und statistischen Übersicht wurden die absoluten Gesamtmengen wie oben beschrieben pro lebende Zelle berechnet und normalisiert. Im Gegensatz zu den funktionellen Unterschieden zwischen den Subpopulationen, die nach CpG-A-Stimulation in der IFN- α -Produktion detektiert wurden, konnte keine Differenz in der Sekretion von proinflammatorischen Zytokinen IL-6 (Abb. 47A), TNF- α (Abb. 47B), IFN- γ (Abb. 47C) und IL-12p70 (Abb. 47D) beobachtet werden. Ebenso waren keine Unterschiede in der Hochregulation des kostimulatorischen Moleküls CD86 zwischen den Subpopulationen nach CpG-B-Stimulation zu sehen (Abb. 47E).

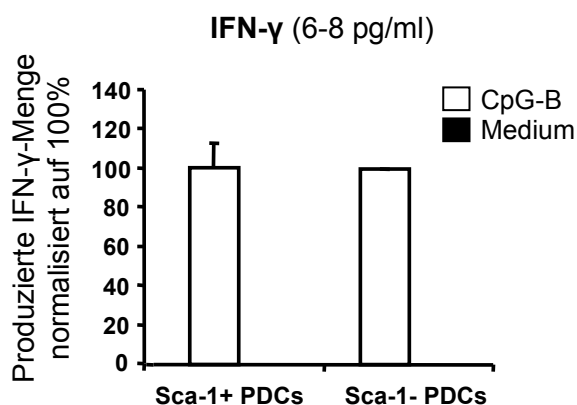
(A)



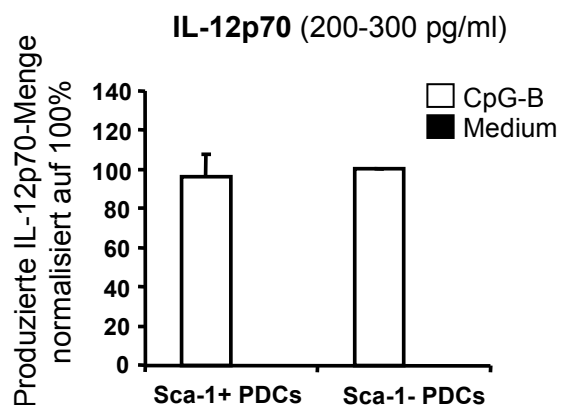
(B)



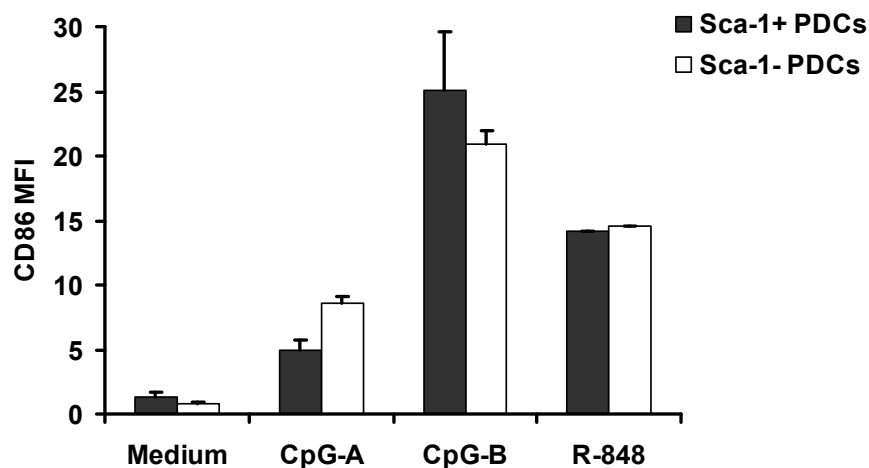
(C)



(D)



(E) Durchschnittliche Fluoreszenzintensität der CD86 Färbung

**Abbildung 47. Produktion von proinflammatorischen Zytokinen in Sca-1⁺ und Sca-1⁻ PDCs nach Stimulation des lysosomalen TLR9-Signalweges**

PDCs wurden aus der Milz von BALB/c-Mäusen mit Hilfe der magnetischen und durchflusszytometrischen Sortierung aufgrund der charakteristischen Expression von mPDCA-1 und Sca-1 isoliert (Reinheiten $\geq 98\%$). Anschließend wurden die Zellen mit und ohne 5 $\mu\text{g/ml}$ CpG-B (ODN 1668) für 17 h kultiviert und die Zellkulturüberstände mittels eines zytometrischen Bead Arrays analysiert. IL-6 (A), TNF- α (B) und IFN- γ (C) konnten dabei detektiert werden. Die Produktion von IL-12p70 (D) wurde mit Hilfe eines ELISAs bestimmt. Die detektierten Mengen wurden pro lebende Zelle berechnet und auf Sca-1⁻ PDCs normalisiert (auf 100% gesetzt). Gezeigt ist der Durchschnitt und SEM von einem Triplikat.

(E) Nach 17 h Kultur mit 5 $\mu\text{g/ml}$ CpG-A ODN 2216 ($n = 2$), CpG-B ODN 1668 ($n = 3$) und R-848 ($n = 1$) wurden Sca-1⁺ und Sca-1⁻ PDCs mit Antikörper gegen CD86 gefärbt. Die durchschnittliche Fluoreszenzintensität (MFI) der CD86 Färbung ist angegeben.

3.12 Osteopontin ist stark hochreguliert in Sca-1⁻ PDCs

Um die molekularen Grundlagen, die zur funktionellen Heterogenität von Sca-1-PDCs führen, besser zu verstehen, wurde eine differentielle Genexpressionsanalyse aus vier unabhängigen Experimenten mit Hilfe eines Microarrays durchgeführt. *In vitro* generierte PDCs wurden in die Sca-1⁺ und Sca-1⁻ PDC-Subpopulation anhand der Expression von mPDCA-1 und Sca-1 mit einer Kombination aus MACS und FACS sortiert. Total-RNA aus $1-2 \times 10^5$ Zellen wurde nach Amplifikation und Markierung mit Cy3 auf Agilent *Whole Mouse Genome Oligo* Microarrays (8x60 K) hybridisiert. Die Datensätze wurden mittels diskriminatorischer Genexpressionsanalyse (DGA) und der funktionellen Genannotation nach der *Gene Ontology* (GO)-Datenbank, die durch die Bioinformatik-Abteilung der Miltenyi Biotec (MIGO) kuratiert wird, prozessiert. In Sca-1⁻ PDCs wurden insgesamt 643 Gene (vgl. Anhang Tabelle S1), die mind. eine 2-fach höhere Regulation im Vergleich zu Sca-1⁺ PDCs aufwiesen, mit

einem p-Wert $\leq 0,05$ detektiert. In Sca-1⁺ PDCs konnten hingegen verglichen mit Sca-1⁻ PDCs nur 121 Gene (vgl. Anhang Tabelle S2), die mind. 2-fach höher exprimiert wurden, bestimmt werden. Allerdings muss an dieser Stelle erwähnt werden, dass ein Gen durch verschiedene Reporteroligonukleotide auf dem Microarray kodiert werden kann und dadurch die tatsächliche Identifikation verschiedener Gene geringer ist.

Gene, die mind. Faktor 6,5 höher in Sca-1⁻ PDCs reguliert waren, sind in Tabelle 4A dargestellt und Gene, die mind. 6,5-fach höher in Sca-1⁺ PDCs exprimiert waren, sind in Tabelle 4B zusammengefasst. Interessanterweise wurde Sca-1 (Ly6a) als das höchste regulierte Gen in Sca-1⁺ PDCs identifiziert (25,3-fach). Zwei weitere Gene wurden mit einer Effektgröße von 22,8 und 18,1 in Sca-1⁺ PDCs hochreguliert: I830127L07Rik und Ly6f. Diese Gene weisen eine hohe Homologie der Nukleotidsequenz ($> 70\%$) zu Sca-1 auf und gehören zur selben Ly6-Familie, die auf Chromosom 15 lokalisiert ist, sodass gleiche Regulationsmechanismen denkbar wären, aber nicht bekannt sind (Fleming *et al.*, 1993). Betrachtet man das am höchsten regulierte Gen in Sca-1⁻ PDCs, so handelt es sich dabei um Spp1 mit einer Effektgröße von 12,9. Spp1 kodiert für Osteopontin (Opn), einem Phosphoglykoprotein, das wichtige Funktionen sowohl intrazellulär (Opn-i) als auch extrazellulär in der sekretierten Form (Opn-s) erfüllt. Für Opn-i wurde gezeigt, dass es essentiell für die endosomal TLR9-abhängige Produktion von IFN- α ist, jedoch keinen Einfluss auf die lysosomal TLR9-abhängige Produktion von proinflammatorischen Zytokinen hat (Shinohara *et al.*, 2006). Somit beeinflusst Opn-i die Induktion von IFN-I nach CpG-A-Stimulation und könnte die funktionelle Heterogenität von Sca-1⁺ und Sca-1⁻ PDCs nach endosomaler TLR9-Aktivierung erklären, bei der Sca-1⁻ PDCs mehr IFN- α im Vergleich zu Sca-1⁺ PDCs aufgrund einer Überexpression von Opn produzieren, während keine Unterschiede nach lysosomaler TLR9-Stimulation mit CpG-B zu detektieren sind. Aus diesen funktionellen Daten geht hervor, dass es sich beim detektierten Opn der Microarray-Analyse, um das intrazelluläre Opn handeln könnte. Diese Hypothese lässt sich allerdings nicht auf der RNA-Ebene überprüfen, da die Regulation der sezernierten und der intrazellulären Isoform von Opn durch die alternative Translation erfolgt (Shinohara *et al.*, 2008).

Tabelle 4. Hochregulierte Gene in Sca-1-PDCs

In vitro generierte PDCs wurden mit Hilfe von Antikörpern gegen Sca-1 und mPDCA-1 nach der magnetischen Anreicherung durchflusszytometrisch in die Sca-1⁺mPDCA-1⁺ und Sca-1⁻mPDCA-1⁺ Subpopulation sortiert (Reinheiten $\geq 97\%$). Danach wurde die Gesamt-RNA isoliert, mit T7-RNA-Polymerase amplifiziert, mit Cy3 markiert und auf Agilent *Whole Mouse Genome Oligo* Microarrays (8x60 K) hybridisiert. Differenziell regulierte Gene wurden mit Hilfe diskriminatorischer Genanalyse (DGA) aus 4 unabhängigen Experimenten ermittelt ($p \leq 0,05$). Aufgelistet sind die Gene, die eine $\geq 6,5$ -fache Expression in Sca-1⁻ PDCs

(A) bzw. in Sca-1⁺ PDCs (B) zeigen (SeqName = Sequenz Name, Refseq ID = NCBI Referenz Sequenz).

(A)

SeqName	Refseq ID	Eingetragene Gen ID	Effektgröße	t-Test p-Wert
Spp1	NM_001204233	20750	12,9	3,64E-02
Fut7	NM_013524	14347	8,6	2,05E-02
Kcnk12	NM_199251	210741	6,6	4,69E-02
Gpsm2	NM_029522	76123	6,6	2,21E-02
Cx3cr1	NM_009987	13051	6,5	2,96E-02

(B)

SeqName	Refseq ID	Eingetragene Gen ID	Effektgröße	t-Test p-Wert
Ly6a	NM_010738	110454	-25,3	7,18E-03
I830127L07Rik	XM_001477102	546643	-22,8	2,05E-02
Ly6f	NM_008530	17071	-18,1	3,48E-02

Zur Validierung der differentiellen Spp1-Expression *in vivo* wurde eine quantitative RT-PCR mit Hilfe der TaqMan-Analyse durchgeführt. Zu diesem Zweck wurde RNA aus sortierten Sca-1⁻ Knochenmark-PDCs und Sca-1⁺ PDCs aus den Lymphknoten verwendet. Wie in Abb. 48 gezeigt, konnte die differentielle Expression von Spp1 in den jeweiligen Subpopulationen bestätigt werden. Sca-1⁻ PDCs aus dem Knochenmark zeigten eine 5-fach höhere Expression von Spp1 verglichen mit Sca-1⁺ Lymphknoten-PDCs.

qRT-PCR zum Nachweis der Spp1-Expression

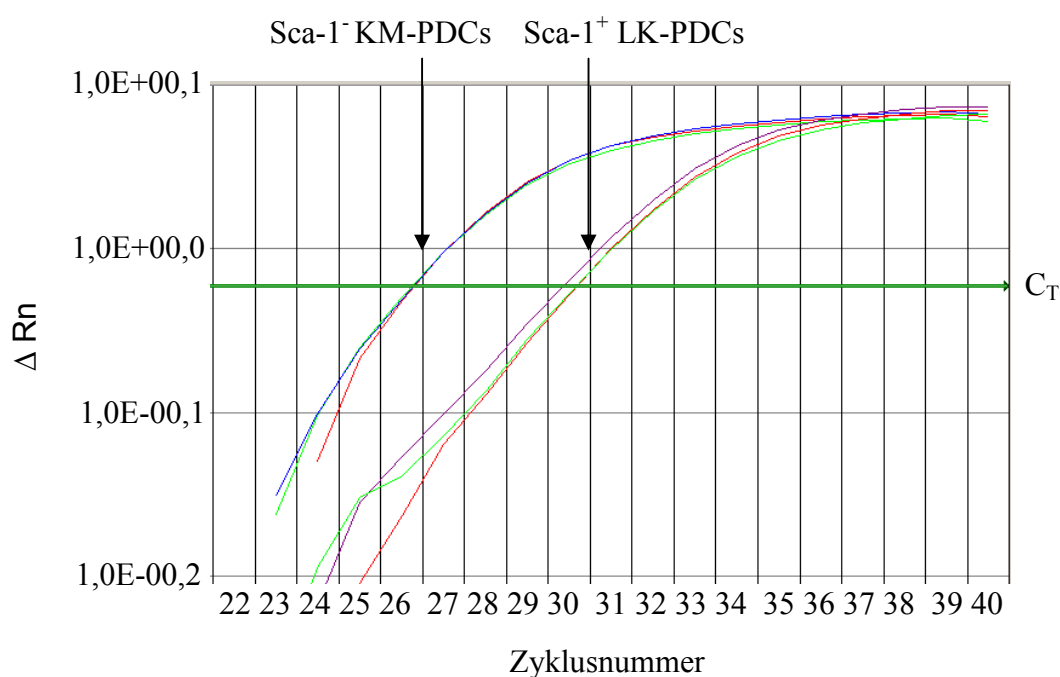
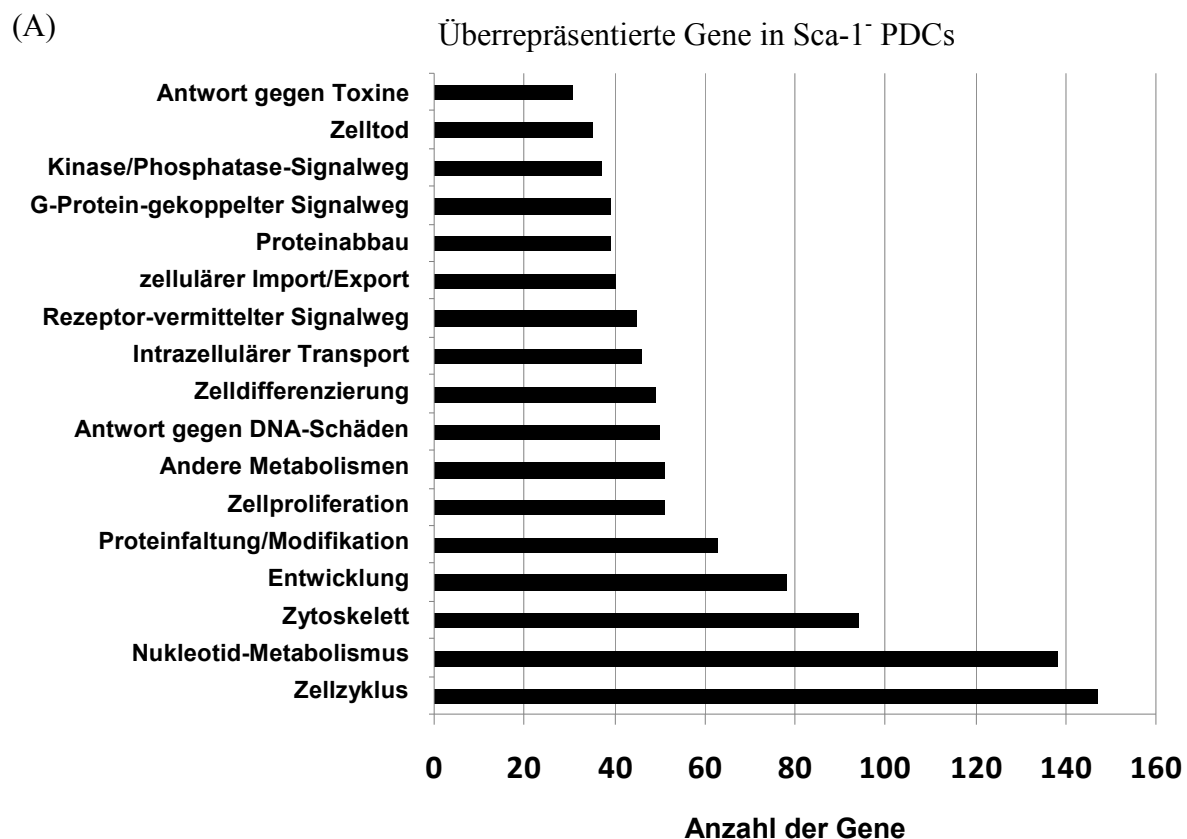


Abbildung 48. Validierung der differentiellen Spp1-Expression in Sca-1⁺ und Sca-1⁻ *ex vivo* PDCs

Sca-1⁺ PDCs aus den Lymphknoten (LK-PDCs) und Sca-1⁻ PDCs aus dem Knochenmark (KM-PDCs) wurden entsprechend der mPDCA-1 und Sca-1-Expression sortiert. Gesamt-RNA wurde extrahiert und mit Hilfe der reversen Transkriptase in cDNA umgeschrieben bevor diese für die SYBR *Green*-basierte RT-PCR auf dem ABI PRISM 7000 SDS eingesetzt wurde. Mit Hilfe der $\Delta\Delta C_T$ -Methode wurden differentielle Unterschiede in der Spp1-Expression zwischen den Sca-1-Subpopulationen bestimmt und entsprechend der GAPDH-Expression normalisiert ($n = 3$) (C_T = Zyklusschwellenwert, *cycle threshold*, R_n = normalisiertes Reportersignal).

Wie oben bereits erwähnt, wurden viele differentiell regulierte Gene in den beiden Sca-1-Subpopulationen detektiert. Eine Klassifikation in unterschiedliche biologische Prozesse der mind. 2-fach höher regulierten Gene in Sca-1⁻ PDCs ist in Abb. 49A und in Sca-1⁺ PDCs in Abb. 49B dargestellt. Übereinstimmend mit den bisherigen Ergebnissen, dass Sca-1⁻ PDCs ein frühes Entwicklungsstadium darstellen und eine erhöhte Proliferation aufweisen, konnten ca. 150 Gene in die Kategorie Zellzyklus und ca. 140 Gene in die Kategorie Nukleotid-Metabolismus einsortiert werden, wodurch die höhere proliferative Aktivität der Sca-1⁻ PDCs bestätigt wird. Die geringe Anzahl an überrepräsentierten Genen in Sca-1⁺ PDCs korreliert mit ihrem reiferen und Art „erschöpften“ Phänotyp.



(B)

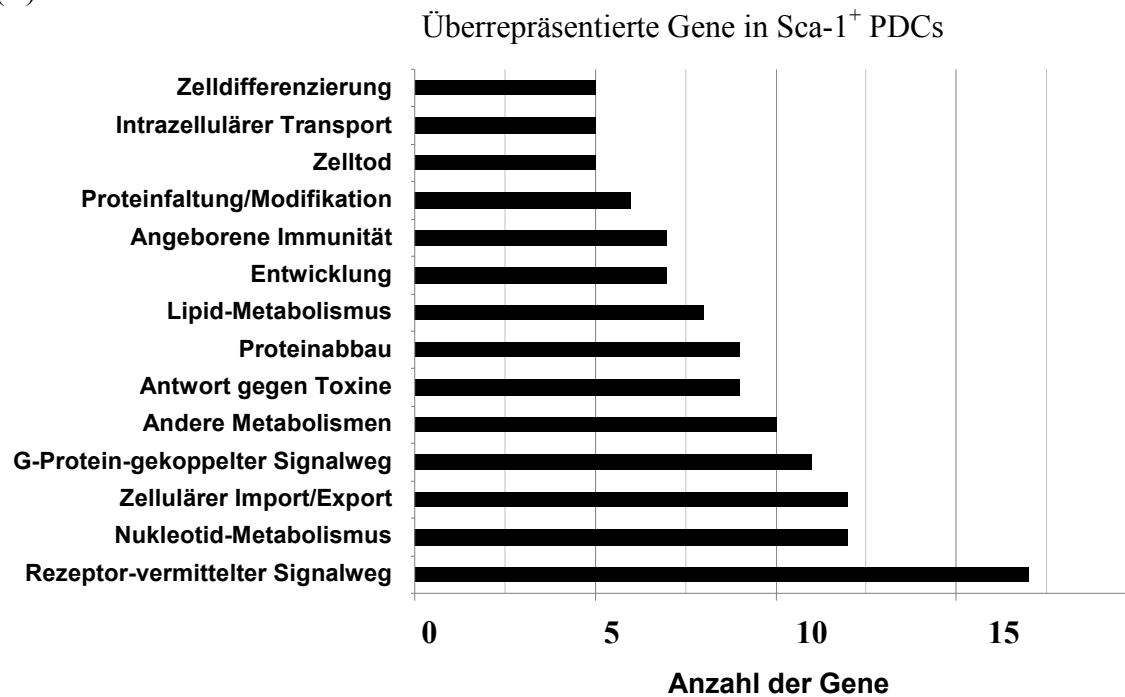


Abbildung 49. Funktionelle Annotation von hochregulierten Genen in Sca-1-PDCs gemäß MIGO

Das Transkriptom von Sca-1⁺ und Sca-1⁻ PDCs wurde mittels Microarray-Analysen verglichen. Gene, die in Sca-1⁻ PDCs (A) bzw. Sca-1⁺ PDCs (B) überrepräsentiert sind, wurden in unterschiedliche biologische Prozesse kategorisiert. In A sind nur Kategorien, denen mehr als 30 Gene zugeordnet werden konnten, gezeigt (n = 4).

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass die Sca-1-Expression in murinen PDCs zwei funktionell unterschiedliche Subpopulationen charakterisiert. Während Sca-1⁺ PDCs einen reifen Phänotyp aufweisen und vor allem in sekundären lymphatischen Organen zu finden sind, repräsentieren Sca-1⁻ PDCs die eigentlichen natürlichen IFN- α -produzierenden Zellen (NIPs) eines frühen Entwicklungsstadiums mit einer hohen Proliferationsaktivität.

4. Diskussion

4.1 Der Ligand von CD303: Seine Eigenschaften und Funktionen

Die Produktion von Typ I Interferonen (IFN-I) ist der Schlüsselmechanismus zur antiviralen Abwehr durch das angeborene Immunsystem (Samuel, 2001). PDCs wurden als Hauptproduzenten von IFN-I beschrieben, weil sie bis zu 1000-fach mehr IFN-I im Vergleich zu anderen Zellen produzieren (Liu, 2005). Ein wichtiger Oberflächenmarker, der zur Identifikation von humanen PDCs verwendet wird, ist CD303 (BDCA-2). CD303 ist ein Typ II C-Typ-Lektin und wird spezifisch nur auf humanen PDCs exprimiert (Dzionek *et al.*, 2001). Mit Hilfe eines CD303-spezifischen Antikörpers (AC144) konnte gezeigt werden, dass CD303 ein Signal- und Aufnahmerezeptor ist (Dzionek *et al.*, 2001). Nach Bindung von AC144 assoziiert CD303 mit der FcR γ -Kette und führt über Tyrosinphosphorylierungen und einer intrazellulären Calciumoszillation zur Aktivierung des BCR-ähnlichen Signalosoms und einer Inhibition der IFN- α -Produktion in PDCs (Cao *et al.*, 2007; Röck *et al.*, 2007). Der Verlust der Regulation der IFN- α -Expression spielt eine entscheidende Rolle in vielen Autoimmunerkrankungen wie SLE (systemischer Lupus erythematoses) und Psoriasis, bei denen erhöhte Mengen an IFN- α den Verlauf der Krankheit negativ beeinflussen (Baccala *et al.*, 2007; Yao *et al.*, 2008). Die Identifikation eines natürlichen CD303-Liganden (CD303L) könnte unter der Annahme, dass die CD303L-Bindung analog zur Antikörperbindung einen inhibitorischen Effekt auf die IFN- α -Produktion in PDCs auslöst, eine potentielle Therapiemöglichkeit von Autoimmunerkrankungen sein. Zu diesem Zweck sollte im ersten Teil dieser Arbeit der natürliche Ligand von CD303 isoliert und charakterisiert werden.

Die durchgeführten Methoden basierten auf der Herstellung von rekombinanten Proteinen, die durch B. Kolbe begonnen wurde (Kolbe, 2004; Kolbe, 2010). Die extrazelluläre Domäne von CD303, die die Kohlenhydrat-erkennende Domäne (CRD) beinhaltet und über welche die Bindung zum Liganden vermittelt wird (Weis *et al.*, 1998), wurde an zwei verschiedene Tags (HA- und Fc-Tag) fusioniert. Unspezifische Bindungen durch den HA- und den Fc-Tag des humanen IgG1-Moleküls des rCD303-Proteins wurden durch das Kontrollprotein rHA/Fc überprüft. Die Verwendung des HA- bzw. Fc-Tags ermöglicht die Detektion, die Isolation und die Aufreinigung der rekombinanten Proteine über Affinitätschromatographie (Nilsson *et al.*, 1997; Lo *et al.*, 1998; Flanagan *et al.*, 2007; Uhlen *et al.*, 1983; Field *et al.*, 1988). Biochemische Eigenschaften der verwendeten Tags beeinflussen dabei die Stabilität und die Löslichkeit des gesamten Proteins (Stevens *et al.*, 2001). Für die Produktion der rCD303- und rHA/Fc-Proteine wurde die eukaryotische Zelllinie CHO DG44 verwendet, wodurch eine effiziente Proteinfaltung, Proteinassemblierung und posttranslationale Modifikation der Proteine im Vergleich zu prokaryotischen Systemen gewährleistet wurde (Jenkins und Curling,

1994; Wurm, 2004; Sodoyer, 2004). Die Glykosylierung von CD303 kann dabei die CD303L-Bindung beeinflussen, so wie es für andere Rezeptoren beschrieben wurde (Niu *et al.*, 2000; Ghanekar *et al.*, 2004; Nonaka *et al.*, 2008). Um dies zu testen, wurden sowohl N-glykosidische Bindungen durch PNGase F bzw. IgGZERO, das spezifisch IgG-Moleküle deglykosyliert, als auch O-glykosidische Bindungen durch O-Glycanase von rCD303 enzymatisch gespalten. Das behandelte Protein, bei dem hauptsächlich N-Glycane von der CD303-Domäne entfernt wurden, wurde in durchflusszytometrischen Analysen eingesetzt. Es konnte kein Effekt auf die CD303L-Bindung im Vergleich zum unbehandelten Protein beobachtet werden. Die Ligandenbindung wird folglich nicht über Glykosylierungsstrukturen auf rCD303 vermittelt.

Eine weitere wichtige Eigenschaft von C-Typ-Lektinen ist die Ca^{2+} -abhängige Bindung zu ihren Interaktionspartnern (Drickamer und Fadden, 2002; Kogelberg und Feizi, 2001). Für rCD303 konnte die Ca^{2+} -Abhängigkeit bestätigt werden, denn ein Austausch des Ca^{2+} -haltigen Puffers durch einen EDTA-haltigen Puffer führte zu einer starken Reduktion der Bindungsaktivität von rCD303 zu seinem Liganden. Diese Tatsache wurde bei den weiterführenden Experimenten zur Isolation des CD303L berücksichtigt.

Um die Rezeptor-Ligand-Interaktion zu untersuchen, wurden die rekombinanten Proteine rCD303 und rHA/Fc (als negative Kontrolle) in der Durchflusszytometrie getestet. In einem großen Zelllinienscreen konnten viele CD303L^+ und wenige CD303L^- Zelllinien, aber auch Primärzellen identifiziert werden. Eine starke Bindung von rCD303 konnte auf der Zelloberfläche von vielen humanen Krebszelllinien (Melanom, Brustadenokarzinom und weiteren Zelllinien) detektiert werden. Bei Krebserkrankungen spielen Veränderungen des Proteoms eine wichtige Rolle. Häufig weisen Glykoproteine oder Glykokonjugate der Zelloberflächen veränderte Glykosylierungsmuster auf. Tumorzellen nutzen diese Modifikationen für neu entstehende Möglichkeiten der Zell-Zell-Adhäsion und Zellmigration, um ins Gewebe einzudringen und Metastasierung zu fördern (Aarnoudse *et al.*, 2006). So wurde für DC-SIGN, einem weiteren Vertreter der C-Typ-Lektine beschrieben, dass es Tumor-assoziierte endogene Liganden CEA (*carcinoembryonic antigen*) und MUC1 (*mucin 1*) bindet (Berinstein, 2002; Denda-Nagai und Irimura, 2000; Kotera *et al.*, 1994). Dabei führt eine erhöhte Expression der Zucker Lewis X und Lewis Y, über die die Bindung zu DC-SIGN vermittelt wird, zu einer Onkotransformation der Antigene und zu einer schlechten Prognose des Krankheitsverlaufes aufgrund von Induktion systemischer Toleranz und eingeschränkter DC-Funktion durch Inhibition der DC-Reifung (van Gisbergen *et al.*, 2005a; van Kooyk, 2008). Somit ist es denkbar, dass auch CD303 Tumor-assoziierte Antigene (TAA) auf verschiedenen Krebszellen bindet. Diese können dann eine Inhibition der IFN-I-Sekretion in PDCs auslösen und somit

der Immunantwort entfliehen. Eine ähnliche Wirkung wurde bereits für Prostaglandin E2 (PGE2) beschrieben. Tumorzellen exprimieren PGE2 und inhibieren über eine Interaktion mit PG-Rezeptoren die Produktion von IFN-I in aktivierten PDCs, wodurch ein tolerogener PDC-Phänotyp induziert wird (Fabricius *et al.*, 2010; Bekereditjan-Ding *et al.*, 2009). Ein weiterer Inhibitionsmechanismus, den Tumorzellen durch die CD303-Ligation zur Immunflucht nutzen könnten, wurde von Riboldi und Kollegen im Jahre 2009 beschrieben (Riboldi *et al.*, 2009). Die Bindung des CD303-spezifischen Antikörpers führt neben einer Inhibition der IFN- α -Produktion (Dzionek *et al.*, 2001) auch zur Inhibition der TRAIL (*TNF-related apoptosis-inducing ligand*)-Sekretion in PDCs. Dadurch wird die zytotoxische PDC-Aktivität, die eine Apoptose TRAIL-sensitiver Tumorzellen induziert, unterdrückt (Riboldi *et al.*, 2009). Die Tatsache, dass der Ligand (oder ein Ligand) von CD303 auf der Oberfläche der Zelllinien nachgewiesen wurde, deutet darauf hin, dass er membrangebunden vorliegen muss. Dabei kann es sich um ein transmembranes oder peripheres Protein handeln, das sehr wahrscheinlich glykosyliert vorliegt, wodurch eine Interaktion mit CD303 ermöglicht wird. Auf der anderen Seite kann die Bindung auch über Glykolipide erfolgen, auf die in der vorliegenden Arbeit allerdings kein Fokus gelegt wurde. Für viele C-Typ-Lektine wurden bereits diverse Zuckerliganden beschrieben, die aufgrund der CRD-Spezifität bestimmt werden. Mannose-Typ-Lektine beinhalten ein EPN-Motiv und folglich erkennt der Mannose-Rezeptor (MR) der Makrophagen Mannose-artige Strukturen (Taylor *et al.*, 2005). DC-SIGN oder Langerin binden ebenso Mannose- und/oder Fucose-endständige Glycane (Taylor *et al.*, 2005; Stambach und Taylor, 2003). Galactose-Typ Lektine (QPD-Motiv) wie MGL erkennen Galactose oder N-acetylgalactosamin (GalNAc)-endständige Glycane (van Vliet *et al.*, 2005). Der Verdacht lag nahe, dass auch CD303 Zucker bindet. Diese Hypothese wurde durch Arbeiten von Riboldi und Kollegen im Jahre 2011 bestätigt. CD303 konnte als ein Rezeptor für terminale asialo Galactosyl-Oligosaccharide identifiziert werden (Riboldi *et al.*, 2011). Vergleichbar mit der vorliegenden Arbeit basierten die Analysen von Riboldi und Kollegen auf der Herstellung eines rekombinanten CD303-Proteins. Das Protein beinhaltete die CRD-Domäne, wurde *in vitro* biotinyliert und anschließend an ein Streptavidin-Molekül konjugiert, um ein tetrameres rCD303-Protein zu generieren. Unter der Verwendung des tetrameren rCD303-Proteins bestätigten Riboldi und Kollegen in durchflusszytometrischen Analysen, dass der CD303L auf Tumorzelllinien exprimiert wird. Sowohl die Brustkarzinom-Zelllinie MCF7 als auch die T-Zell-Leukämie-Zelllinie Jurkat wurden übereinstimmend mit dieser Arbeit in beiden Studien als CD303L⁺ beschrieben (Riboldi *et al.*, 2011). Durch Glycan-Array-Analysen des Consortiums für *Functional Glycomics* (CFG) konnte die CD303-bindende Zuckerstruktur identifiziert werden. Trotz einer erwarteten Spezifität für Mannose-

modifizierte Antigene bindet CD303 terminale β 1-4 oder β 1-3 Galactose eines Komplexes bestehend aus zwei Antennen, welcher unmaskiert durch Sialinsäure vorliegt. Eine Modifikation der Galactosereste durch Sialinsäure führt zu einer kompletten Inhibition der CD303-Bindung (Riboldi *et al.*, 2011). Der Einfluss der Zuckerbindung auf die Funktionalität von CD303 wurde durch Kokulturanalysen gezeigt. CD303L⁺ Monozyten, die ebenfalls in der vorliegenden Arbeit als solche identifiziert werden konnten, wurden mit CpG-A-aktivierten PDCs kokultiviert. Eine Inhibition der IFN- α -Produktion in PDCs konnte beobachtet werden. Dieser Mechanismus erlaubt Tumorzellen, wie oben bereits erwähnt, IFN-I-abhängigen Immunantworten zu entfliehen und Monozyten eine überschüssige IFN-I-Produktion durch aktivierte PDCs unter pathologischen Bedingungen zu verhindern (Riboldi *et al.*, 2011). Entgegen diesen Ergebnissen wurde eine reine Zuckerstruktur als Ligand durch vorherige Studien ausgeschlossen (Kolbe, 2010). Eine Deglykosylierung N-verlinkter Zucker mit PNGase F auf der Zelloberfläche von CD303L⁺ Zellen hatte nämlich keinen Einfluss auf die Bindung von rCD303. Eine Behandlung der Zellen mit der Protease Papain hingegen inhibierte die Bindung von rCD303 an seinen Liganden auf der Zelloberfläche, sodass schlussgefolgert wurde, dass der Ligand zumindest Protein-assoziiert vorliegen muss (Kolbe, 2010). Ein weiterer Punkt der nicht mit den Ergebnissen von Riboldi und Kollegen korreliert, ist die Identifikation von B-Zellen als CD303L-exprimierende Zellen. Neben Monozyten konnten auch B-Zellen in der vorliegenden Arbeit, aber auch in Arbeiten von Kolbe (Kolbe, 2010), mit dem rCD303-Protein durchflusszytometrisch gefärbt werden. PDCs spielen eine entscheidende Rolle in der Regulation der B-Zell-Differenzierung (Jego *et al.*, 2003; Poeck *et al.*, 2004; Douagi *et al.*, 2009). Die Sekretion von IFN-I und IL-6 Virus-stimulierter PDCs führt zu einer Differenzierung der humanen B-Zellen in Antikörper-produzierende Plasmazellen (Jego *et al.*, 2003). Darüber hinaus konnten Shaw und Kollegen zeigen, dass PDCs direkt über den Mitglied der TNF-Familie CD70 mit CD27-exprimierenden B-Zellen interagieren und dadurch das Wachstum von naiven B-Zellen kontrollieren können (Shaw *et al.*, 2010). Weiterhin konnte belegt werden, dass PDCs die Aktivierung autoreaktiver B-Zellen über die Interaktion von ICAM-1 und LFA-1, aber auch über lösliche Faktoren, regulieren (Ding *et al.*, 2009). Es ist durchaus denkbar, dass nicht nur PDCs die Entwicklung und Aktivierung der B-Zellen kontrollieren, sondern auch umgekehrt. B-Zellen könnten über einen direkten Zell-Zell-Kontakt von CD303L und CD303 regulatorische Funktionen auf die PDC-vermittelte angeborene Immunantwort ausüben und Toleranz induzieren (negativer *feedback loop*). Dieser Mechanismus kann in Autoimmunerkrankungen eine wichtige Rolle spielen. Erhöhte Titer an IFN- α im Serum von SLE-Patienten korrelieren mit der Entwicklung und der Schwere der Krankheit (Preble *et al.*, 1982; Blanco *et al.*, 2001; Baechler *et al.*, 2004). Neben

Autoantikörper-produzierenden B-Zellen, wird auch die Differenzierung von Monozyten in mDCs durch IFN- α gefördert. Diese phagozytieren und präsentieren die Antigene apoptotischer Zellen, was Autoimmunität verstärken kann (Pascual *et al.*, 2003; Ronnblom und Pascual, 2008). Man kann annehmen, dass unter normalen Bedingungen sowohl CD303L-exprimierende B-Zellen als auch Monozyten über eine Interaktion mit CD303 die Funktionen der PDCs regulieren. Unter pathologischen Bedingungen kann diese Interaktion aufgrund von fehlender bzw. abnormaler Expression von CD303L nicht mehr erfolgen, was zur unkontrollierten Ausschüttung von IFN- α führen kann. Eine indirekte Interaktion zwischen PDCs und Monozyten wurde von Shi und Kollegen beschrieben (Shi *et al.*, 2012). Sie konnten zeigen, dass HBsAg (*plasma-derived hepatitis B surface antigen*), ein Oberflächenprotein des Hepatitis B-Virus (HBV), einen inhibitorischen Effekt auf PDCs aufgrund einer Sekretion von TNF- α und IL-10 durch Monozyten in chronischen Hepatitis B-Patienten ausübt. Diese löslichen Zytokine bewirken eine Runterregulation von TLR9 und eine Inhibition der IFN- α -Sekretion in PDCs, wodurch die immunregulatorische Funktion der PDCs im Kampf gegen HBV ausgeschaltet wird (Shi *et al.*, 2012). Darüber hinaus wurde für HBsAg nicht nur eine indirekte Rolle im Zusammenhang mit der PDC-Regulation beschrieben. Im Gegenteil, Xu und Kollegen zeigten, dass HBsAg direkt an den inhibitorischen CD303-Rezeptor auf PDCs bindet und die TLR9-vermittelte Aktivierung der PDCs und die Produktion von IFN- α in PDCs inhibiert (Xu *et al.*, 2009).

Diese Ergebnisse zeigen, dass mehrere Liganden von CD303 existieren, wodurch die Diskrepanzen zwischen Riboldis Untersuchungen (Riboldi *et al.*, 2011) und der vorliegenden Studie erklärt werden könnten. Riboldi und Kollegen haben in ihren Analysen das rekombinante CD303-Protein, wie oben bereits erwähnt, als Tetramer eingesetzt. In der vorliegenden Studie konnte unter denaturierenden, reduzierenden Bedingungen ebenfalls eine Multimerbildung festgestellt werden. In SDS-Analysen konnten dimere und trimere rCD303-Komplexe beobachtet werden. In welcher Form das Protein jedoch unter nativen Bedingungen vorliegt, kann an dieser Stelle nicht definiert werden. Multimerisierung von C-Typ-Lektinen innerhalb der Zellmembran kann die Bindung zum Liganden beeinflussen bzw. eine Bindung unterschiedlicher Liganden ermöglichen (Serrano-Gomez *et al.*, 2008; Sierra-Filardi *et al.*, 2009; Weis *et al.*, 1998). So wurden bereits unterschiedliche Liganden eines C-Typ-Lektins beschrieben. DC-SIGN bindet z.B. sowohl ICAM-2 (Garcia-Vallejo *et al.*, 2008; Geijtenbeek *et al.*, 2000a), ICAM-3 (Geijtenbeek *et al.*, 2000c; Bogoevska *et al.*, 2007), BSSL (Naarding *et al.*, 2006), als auch CEACAM1 (van Gisbergen *et al.*, 2005b; Bogoevska *et al.*, 2006). Zwar ist für die Erkennung und Bindung dieser Liganden eine Glykosylierung mit dem Zucker Lewis essentiell, jedoch ist es nicht die einzige Komponente, die eine wichtige Rolle

spielt. Die Orientierung und die Dichte des Zuckers, die sowohl durch die Anzahl der Zucker pro Molekül oder auch durch den Verbund mit anderen Struktur molekülen bestimmt wird, ist ebenso entscheidend (Garcia-Vallejo und van Kooyk, 2009). Somit ist es durchaus denkbar, dass das rCD303-Protein in der Studie von Riboldi (Riboldi *et al.*, 2011) einen anderen Liganden bindet als das Protein, welches in der vorliegenden Arbeit hergestellt und für Nachweisuntersuchungen des CD303L eingesetzt wurde.

Um den natürlichen CD303-Liganden zu isolieren, wurden in dieser Arbeit unterschiedliche Immunpräzipitationsanalysen mit diversen Festphasen-Matrizes durchgeführt. Zum einen wurde Sepharose eingesetzt, das zwar eine hohe Bindungskapazität aufweist, aber auch wie in dieser Arbeit bestätigt, einen hohen Hintergrund durch unspezifisch gebundene Proteine verursacht. Auf der anderen Seite wurden magnetische MicroBeads verwendet. Diese haben den Vorteil, dass der Hintergrund unspezifischer Bindungen an die nicht poröse Matrixoberfläche geringer ist. Weiterhin erfolgen die Waschschritte viel schneller, da diese über Säulen in magnetischen Separatoren und nicht über die Zentrifugation laufen. Jedoch haben die magnetischen Partikel eine geringere Kapazität (Karlsson und Platt, 1991).

Keiner der Immunpräzipitationsansätze führte zur Isolation des CD303L. Zwar konnte GAPDH mit Hilfe der direkt gekoppelten rCD303-Sepharose präzipitiert werden. Nachfolgende Validierungsanalysen haben jedoch gezeigt, dass es als CD303L ausgeschlossen werden kann. Die Identifikation von GAPDH beruht wahrscheinlich auf unspezifischen Wechselwirkungen mit rCD303 oder der Sepharose. Dieses Ergebnis zeigt, dass nicht nur die Wahl der Matrix, sondern auch die Art der Membranpräparation bei der Probenaufarbeitung eine wichtige Rolle spielt. Da der Ligand von CD303 auf der Zelloberfläche nachgewiesen werden konnte, wurde der Fokus auf Membranproteine gelegt. Es wurden verschiedene Methoden zur Isolation dieser Proteine getestet (totale Zelllyse, Membranpräparation mit Hilfe eines Extraktionskits bzw. der Ultrazentrifugation). Allerdings führte keine der Methode zu einer ausschließlichen Isolation von Membranproteinen. Massenspektrometrische Analysen bestätigten eine Kontamination von zahlreichen zytoplasmatischen Proteinen wie Ribosomen. Obwohl für GAPDH auch Funktionen als Transferrin- und Laktoferrin-Rezeptor an der Zelloberfläche beschrieben sind, übernimmt es primär eine essentielle Rolle in der Glykolyse und ist somit ebenfalls intrazellulär lokalisiert (Raje *et al.*, 2007; Kumar *et al.*, 2012; Rawat *et al.*, 2012). Eine weitere Schwierigkeit bei der Isolation von Membranproteinen besteht in ihrer hydrophoben Eigenschaft und der damit verbundenen schlechten Löslichkeit der Proteine. Die Wahl des richtigen Detergenz und dessen Konzentration bestimmt die Ausbeute der Membranproteine bei der Präparation (Seddon *et al.*, 2004). Allgemein wurden bei den durchgeführten Immunpräzipitationsansätzen nur wenige Membranproteine identifiziert. Der

Verlust der Membranproteine bei der Probenvorbereitung durch die gewählten Bedingungen bedeutet einen potentiellen Verlust des CD303L aufgrund von Aggregation durch unzureichende Proteinsolubilisation. Zudem besteht bei der Probenvorbereitung immer die Gefahr des Proteinabbaus, was mit dem Zeitaufwand der Probenvorbereitung korreliert. Durch den Aufschluss der Membranen können Oberflächenproteine aus ihrem natürlichen Mikromilieu extrahiert werden und dadurch die Bindungsfähigkeit zu ihren Liganden verlieren, wenn diese zusätzlich vom Mikromilieu abhängig ist (Savas *et al.*, 2011; Lee, 2004). Das kann ein Grund dafür sein, dass der CD303L nicht mit Hilfe der Immunpräzipitation isoliert werden konnte.

Um diese Probleme zu umgehen, wurde in einer Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Dr. B. Wollscheid der ETH Zürich eine neue Methode zur direkten Identifikation der Ligand-Rezeptor-Interaktion eingesetzt: *Ligand-based Receptor Capturing* (LRC) (Frei *et al.*, 2012). Transiente Interaktionen von Ligand und Rezeptor auf lebendigen Zellen können mit Hilfe eines trifunktionellen Moleküls TRICEPS unter beinahe physiologischen Bedingungen kovalent über Kohlenhydratstrukturen kreuzvernetzt werden. Der Ligand kann in einem nächsten Schritt nach dem Proteinverdau und einem Aufreinigungsschritt spezifisch und selektiv massenspektroskopisch identifiziert werden, so wie es unter anderem für Insulin, Transferrin, Apelin und den epidermalen Wachstumsfaktor (EGF) bestätigt wurde (Frei *et al.*, 2012). Mit dieser Methode konnte CD222 (Mannose-6-Phosphat-Rezeptor, *Insulin-like Growth Factor 2 Receptor*) zwar als ein Ligand von CD303 identifiziert, aber in nachfolgenden Analysen nicht validiert werden. Die Identifikation von endständigen asialo Galactosyl-Oligosacchariden als CD303L (Riboldi *et al.*, 2011) zeigt allerdings, dass CD303 eine generelle Affinität für Oligosaccharide hat. Dies erschwert die Isolation eines definierten CD303-Proteinliganden mit Hilfe von LRC. Da mehrere Oberflächenproteine eine β 1-3 bzw. β 1-4-Galactosyl-Modifikation tragen können, kann mit Hilfe von rCD303 (bzw. mit jeder neuen Produktionscharge von rCD303) eine Vielzahl unterschiedlicher CD303L bestimmt werden und dadurch die Reproduktion der Ergebnisse minimiert werden.

Der Einsatz von rCD303 in der Durchflusszytometrie führte aufgrund seiner Bindungseigenschaften an die Zelloberfläche diverser Zelllinie zur Definition von CD303L⁺ und CD303⁻ Zelllinien. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass der AC144-Antikörper eine inhibitorische Funktion in PDCs auslöst (Dzionic *et al.*, 2001). Um zu untersuchen, ob der mit Hilfe von rCD303 detektierte Ligand ebenfalls funktionelle Eigenschaften hat, wurde ein funktionelles Reportersystem etabliert, der auf einem NFAT-GFP-Konstrukt basierte. Mit Hilfe einer solchen Reporterzelllinie konnte der funktionelle Ligand von dem Rezeptor ILT7, der ebenfalls spezifisch auf humanen PDCs exprimiert wird, als BST2 identifiziert werden (Cao *et al.*, 2009; Cao *et al.*, 2006). Sowohl CD303 als auch die FcR γ -Kette wurden in der A95-

KK NFAT-GFP-Reporterzelllinie exprimiert und führten am Beispiel des AC144-Antikörpers nach dessen Bindung zu einer NFAT-abhängigen Expression von GFP. Es konnte allerdings kein funktioneller Ligand von CD303 nach diversen Kokultorexperimenten und durchgeführten Optimierungen der Testbedingungen identifiziert werden. Sowohl verschiedene Zelllinien, als auch Primärzellen, Zucker- und Pathogenstrukturen führten zu keiner GFP-Expression nach Kokultur mit dem NFAT-GFP-Reporter. Obwohl CD303 terminale β 1-4 oder β 1-3 Galactose eines Komplexes bindet, konnte kein Signal in der Reporterzelllinie mit linearen Einheiten des Monosaccharids β -D-Galactose in Kokulturanalysen induziert werden. Der Grund hierfür könnte in der Komplexität der Zuckererkennung liegen. Unmodifizierte und endständige β 1-4 oder β 1-3 Galactose wurde nur in Verbindung mit mindestens zwei Antennen von CD303 gebunden (Riboldi *et al.*, 2011). Monozyten, die in Riboldis Studie als Träger inhibierender CD303L beschrieben wurden (Riboldi *et al.*, 2011), konnten in der vorliegenden Studie kein Signal nach Interaktion mit CD303 auslösen. Wie lässt sich das erklären? Reicht die Sensitivität des artifiziellen NFAT-GFP-Systems nicht aus? Fehlen weitere Signalkomponenten? Zwar wurde die Funktionalität des Reportersystems mit Hilfe des Antikörpers bestätigt, allerdings haben Untersuchungen von Kolbe gezeigt, dass sowohl der CD303-spezifische Antikörper AC144 als auch der Ligand an unterschiedliche Epitope von CD303 binden, da eine Inhibition der CD303L-Bindung mit rCD303 auf der Zelloberfläche positiver Zellen durch einen Überschuss an AC144 nicht möglich war (Kolbe, 2010). Weiterhin wird eine Kreuzvernetzung von CD303 mit AC144 benötigt, um ein Signal im Zellinnern auszulösen, da eine Stimulation von PDCs mit Fab-Fragmenten von AC144 keine Signalinduktion in PDCs bewirkt (Jähn *et al.*, 2010). Das bedeutet, dass sowohl das Bindungsepitop als auch die Fähigkeit zur Kreuzvernetzung des Liganden für die Signalinduktion in der NFAT-GFP-Reporterzelllinie essentiell ist.

Martinelli und Kollegen zeigten, dass das rekombinant hergestellte gp120-Protein des HI-Virus an CD303 bindet und eine Inhibition der IFN-I-Sekretion in PDCs induziert (Martinelli *et al.*, 2007). Diese Interaktion wurde durch den Einsatz eines trimeren gp120-Proteins, wodurch eine höhere Avidität der Bindung erreicht wurde und dem natürlichen Vorkommen des Proteins in Virionen entspricht, verstärkt (Martinelli *et al.*, 2007). Kokultorexperimente mit HIV-1-Partikeln aus unterschiedlicher Herstellung mit dem NFAT-GFP-Reporter konnten in dieser Studie allerdings keine funktionelle Signalinduktion in der Reporterzelllinie initiieren. Der Grund dafür könnte mit der Produktion des rekombinanten gp120-Proteins zusammenhängen. Vor allem die N-glykosidisch modifizierte Form des gp120 wurde durch den gewählten Aufreinigungsprozess über eine GNA (*Galanthus nivalis* agglutinin)-Lektinsäule und einer anschließenden Elution des Proteins mit α -Mannopyranosid angereichert

(Martinelli *et al.*, 2007; Mossman *et al.*, 1996). Es ist von daher nicht auszuschließen, dass die Interaktion des gp120-Proteins mit CD303 über diese Zuckerstrukturen vermittelt wird. Weiterhin haben Martinelli und Kollegen gezeigt, dass die Interaktion von CD303 und gp120 stark mit der Avidität der Bindung zusammenhängt (Martinelli *et al.*, 2007). Diese kann in einem intakten Viruspartikel variabel oder nicht sensitiv genug sein, wodurch ein Signal in der NFAT-GFP-Reporterzelllinie nach Bindung von CD303 nicht ausgelöst werden kann. Eine Interaktion mit gp120 wurde bereits für weitere C-Typ-Lektine beschrieben, wodurch adaptive Immunantworten im Kampf gegen HIV-1 moduliert werden können (Geijtenbeek *et al.*, 2000b; de Witte *et al.*, 2007). DC-SIGN z.B. bindet an gp120 und erleichtert den Transport des Virus zu sekundären lymphoiden Organen, wo CD4⁺ T-Zellen effizient transinfiziert werden können (Geijtenbeek *et al.*, 2000b). Im Gegensatz dazu ist Langerin eine natürliche Barriere für die HIV-1-Übertragung durch Langerhans-Zellen, weil HIV-1, welches über Langerin internalisiert wird, direkt abgebaut wird (de Witte *et al.*, 2007). C-Typ-Lektine haben demnach unterschiedliche Funktionen bei einer viralen Infektion. Im Falle von CD303 nutzt HIV-1 einen Inhibitionsmechanismus, um PDCs auszuschalten und der Immunantwort zu entkommen (Martinelli *et al.*, 2007).

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass in der vorliegenden Arbeit durch die gewählten Methoden kein funktioneller CD303-Ligand isoliert werden konnte. Die Identifikation von endständigen β 1-3 und β 1-4 asialo-Galactosyl-Oligosacchariden, die in einem Biantennenkomplex an CD303 binden (Riboldi *et al.*, 2011), gibt neue Forschungsmöglichkeiten zur Bestimmung der endogenen Moleküle, die diese glykosidischen Modifizierungen tragen und somit die biologischen Funktionen von CD303 regulieren und kontrollieren. Die Erkenntnisse über diese endogenen Liganden könnten helfen, die Rolle von PDCs in Tumor- und Autoimmunerkrankungen zu verstehen, um Therapiemöglichkeiten im Kampf gegen diese Krankheiten zu entwickeln.

4.2 Sca-1 definiert unterschiedliche Subpopulationen von murinen PDCs, die eine Heterogenität im endosomalen, aber nicht im lysosomalen TLR9-Signalweg aufweisen

Durch die Produktion von IFN-I und die Induktion der T-Zell-Immunität oder Toleranz spielen PDCs eine wichtige Rolle in der adaptiven und der angeborenen Immunabwehr (Fitzgerald-Bocarsly, 1993; Siegal *et al.*, 1999; Cella *et al.*, 1999; Kadowaki *et al.*, 2000; Grouard *et al.*, 1997). Wie diese Funktionen allerdings reguliert werden, ist unklar. Einige Gruppen haben eine funktionelle Dichotomie innerhalb des PDC-Pools beschrieben, wobei unterschiedliche Immunantworten durch PDCs entweder in Abhängigkeit vom Stimulus ausgelöst werden (Iparraguirre *et al.*, 2008; Jaehn *et al.*, 2008) oder aber durch das Vorhandensein mehrerer PDC-Subpopulationen mit unterschiedlichen Eigenschaften erklärt werden können (Kamogawa-Schifter *et al.*, 2005; Omatsu *et al.*, 2005; Hadeiba *et al.*, 2008; Björck *et al.*, 2011). Der zweite Teil dieser Arbeit zeigt, dass die funktionelle Plastizität der PDC-Population von beiden Mechanismen abhängig sein kann.

Basierend auf der Expression des Stammzellmarkers Sca-1 (Ly-6A) konnten vorherige Analysen von Dr. J. Fischer (Fischer, 2008) und S. Kurig (unveröffentlicht) in der vorliegenden Arbeit bestätigt werden. Zwei verschiedene Entwicklungsstadien von CD11c^{int}CD45R⁺ Ly-6C⁺CD11b⁻ PDCs, die eine unterschiedliche Fähigkeit zur IFN-I-Produktion aufweisen, konnten anhand der Sca-1-Expression im murinen System charakterisiert werden. Sca-1⁻ PDCs wurden als die Hauptproduzenten von IFN- α identifiziert. Sie erscheinen früh in der PDC-Entwicklung und bilden den größten Anteil der PDC-Population im Knochenmark. Ihre Frequenz verringert sich im peripheren Blut und der Milz. In den Lymphknoten bilden sie nur noch einen kleinen Anteil an der gesamten PDC-Population. Eine erhöhte proliferative Aktivität, die Expression der Vorläufermarker CD34 und CD117 (Fischer, 2008; S. Kurig, unveröffentlicht) und die geringe Expression an MHC-Klasse-II-Molekülen dieser Zellen im Knochenmark unterstreicht ihren Charakter der Vorläuferzellen. Sca-1⁺ PDCs hingegen werden hauptsächlich in der Peripherie mit der höchsten Frequenz in den Lymphknoten detektiert. Sie produzieren nur kleine Mengen an IFN-I nach Stimulation mit TLR9-Liganden. Obwohl Sca-1⁻ PDCs eine geringere Expression an MHC-Klasse-II-Molekülen, CD4 und CD8 verglichen mit Sca-1⁺ PDCs aufweisen, zeigen beide Subpopulationen den gleichen Aktivierungsstatus und können unter *steady-state* Bedingungen koexistieren. Sca-1⁻ PDCs verändern ihren Phänotyp und regulieren Sca-1 hoch, wenn sie TLR-vermittelt (*in vitro* und *in vivo*) aktiviert werden oder in Kontakt mit Gewebe-spezifischen Faktoren *in vivo* kommen. Die Organ-spezifische Hochregulation von Sca-1 in Sca-1⁻ PDCs kann dabei nicht auf eine Aktivierung der Zellen zurückgeführt werden, da kostimulatorische Moleküle nicht hochreguliert werden. Dieser Effekt wird viel mehr durch das Mikromilieu der Zellen vermittelt.

Eine Konversion des Sca-1⁻ Phänotyps in den Sca-1⁺ Phänotyp wird durch die CpG-A-vermittelte IFN- α -Produktion induziert. Allerdings können auch andere Faktoren diese Umwandlung bewirken, da eine Stimulation mit CpG-B und R-848 den gleichen Effekt hat.

In der Vergangenheit wurden bereits einige Oberflächenmarker zur Unterscheidung funktionell unterschiedlicher PDC-Subpopulationen in der Maus beschrieben (Kamogawa-Schifter *et al.*, 2005; Omatsu *et al.*, 2005; Hadeiba *et al.*, 2008; Schlitzer *et al.*, 2011; Björck *et al.*, 2011). Ly49Q⁻ PDCs wurden im Knochenmark als eine unreife Subpopulation identifiziert (Kamogawa-Schifter *et al.*, 2005; Omatsu *et al.*, 2005), wohingegen eine CCR9-Expression mit einem tolerogenen Phänotypen von PDCs verknüpft wurde und CCR9⁺ PDCs hauptsächlich in der Peripherie gefunden werden konnten (Hadeiba *et al.*, 2008). Es stellte sich die Frage, ob diese Marker denselben PDC-Phänotyp beschreiben und die Expression von Sca-1 mit diesen Markern korreliert. Untersuchungen belegten, dass keine Koexpression aller Marker in den getesteten Organen gezeigt werden konnte. In der Milz, wo eine vergleichbare Proportion Sca-1-exprimierender und nicht exprimierender PDCs vorliegt, detektierte man einen hohen Anteil an PDCs, die eine Koexpression von Ly49Q und CCR9 aufwiesen. Ly49Q⁺CCR9⁺ Zellen beinhalteten somit einen Anteil an Sca-1⁻ PDCs. Dieses Verhältnis änderte sich im Knochenmark, wo aufgrund geringerer Expression von Ly49Q und gleichbleibender Expression von CCR9 keine hohe Korrelation der Koexpression mehr zu detektieren war. Obwohl alle Ly49Q⁻CCR9⁻ PDCs negativ für die Sca-1-Expression sind, konnten Sca-1⁻Ly49Q⁻CCR9⁺ und Sca-1⁻Ly49Q⁺CCR9⁺ PDCs nachgewiesen werden. Sca-1⁺ PDCs exprimierten hingegen einheitlich sowohl Ly49Q als auch CCR9. Diese Daten deuten darauf hin, dass die genannten Marker unterschiedliche Entwicklungsstadien von PDCs definieren. Die frühen PDCs sind negativ für alle drei Marker und regulieren nacheinander die Expression von CCR9, Ly49Q und Sca-1 hoch. Die Arbeitsgruppe um Kamogawa-Schifter zeigte, dass Ly49Q⁻ und Ly49Q⁺ PDCs aus dem Knochenmark die gleiche Menge an IFN- α nach CpG-Stimulation produzierten (Kamogawa-Schifter *et al.*, 2005). Wie eben erwähnt, enthält die Ly49Q⁺ Subpopulation im Knochenmark nur wenige Sca-1⁺ Zellen, die ein geringes Potential zur Produktion von IFN- α besitzen. Somit ist der Anteil an Sca-1⁻ PDCs, die als Hauptproduzenten von IFN- α nach CpG-Stimulation in der vorliegenden Studie identifiziert werden konnten, in Ly49Q⁺ und Ly49Q⁻ PDCs des Knochenmarks vergleichbar und erklärt folglich die ähnlichen Mengen an produziertem IFN- α in beiden Ly49Q-Subpopulationen. CCR9⁺ und CCR9⁻ PDCs aus den Lymphknoten zeigten ebenfalls eine vergleichbare Fähigkeit zur IFN- α -Produktion (Hadeiba *et al.*, 2008). Allerdings stimmt die Tatsache, dass PDCs aus Lymphknoten eine signifikante Menge an IFN- α produzieren können, nicht mit den zuvor beschriebenen Ergebnissen überein, wo Lymphknoten-PDCs nur minimale Spuren an

IFN- α produziert haben (Fischer, 2008). Ein wichtiger Faktor, der die Funktion von PDCs verändern und die Diskrepanzen zwischen den Studien erklären kann, liegt in der *in vivo* Flt3-L-Behandlung von murinen PDCs in Hadeibas Arbeit (Hadeiba *et al.*, 2008). Zur Expansion der PDCs *in vivo* wurden Mäuse mit einer B16-Melanomzelllinie, die den Wachstums- und Differenzierungsfaktor Flt3-L sezerniert (Gilliet *et al.*, 2002), transplantiert. Diese Behandlung führte zu einer signifikanten Produktion von aktivierten CCR9⁻ PDCs in Lymphknoten, die unter normalen Bedingungen in nicht behandelten Mäusen nicht nachzuweisen sind (Hadeiba *et al.*, 2008). Es lässt sich demnach nicht ausschließen, dass die *in vivo* Flt3-L-Behandlung der Mäuse ebenso die Fähigkeit der CCR9-PDCs zur Sekretion von IFN- α beeinflusst, so wie sie die Proportionen der CCR9⁺ und CCR9⁻ Subpopulationen in behandelten Mäusen verändert. Auch Schlitzer und Kollegen beschrieben PDC-Subpopulationen anhand der CCR9-Expression. CCR9⁻ PDCs bilden die Vorläuferpopulation von PDCs, die aber auch die Fähigkeit besitzen unter bestimmten Bedingungen in konventionelle DCs zu differenzieren (Schlitzer *et al.*, 2011). Im Zusammenhang mit der Charakterisierung von CCR9⁺ und CCR9⁻ PDCs untersuchten sie die Expression von Sca-1 in diesen Zellen und zeigen, dass der Anteil Sca-1-exprimierender Zellen in CCR9⁺ PDCs aus dem Knochenmark höher ist verglichen mit CCR9⁻ PDCs aus dem gleichen Organ. In der Milz kann sogar eine höhere Expression von Sca-1 in CCR9⁺ PDCs beobachtet werden (Schlitzer *et al.*, 2011). Schaut man sich die abgebildeten Färbungen am Beispiel der Knochenmark-PDCs in der Arbeit von Schlitzer und Kollegen genauer an, so wird deutlich, dass sich die CCR9⁺ Subpopulation aus zwei Sca-1-Populationen (2 Peaks im Dotplot) und die CCR9⁻ Subpopulation aus einer Sca-1-Population zusammensetzt (Schlitzer *et al.*, 2011). Es besteht der Verdacht, dass die verwendete negative Färbekontrolle (FMO, *fluorescence minus one*) für den Sca-1 Nachweis nicht optimal gesetzt ist oder/und der Fluoreszenz-markierte Sca-1-Antikörper ein zu hohes Hintergrundsignal bei der Färbung erzeugt, was mit der FMO-Methode nicht berücksichtigt wird (Maecker und Trotter, 2006). Würde man die Auswertung aus diesen Gründen unter Verwendung einer spezifischen Isotypkontrolle optimieren, so könnten die Daten genau den zuvor erwähnten Ergebnissen dieser Arbeit entsprechen. CCR9⁺ PDCs enthalten sowohl positive als auch negative Sca-1-Zellen und CCR9⁻ PDCs bestehen nur aus Sca-1⁻ Zellen. Unter dieser Annahme korrelieren dann auch die IFN- α -Produktionsdaten von CCR9⁺ und CCR9⁻ PDCs nach TLR9-Stimulation mit den Ergebnissen dieser Studie. CCR9⁻ PDCs produzieren fast doppelt so viel IFN- α nach CpG-A ODN 2216-Stimulation wie CCR9⁺ PDCs (Schlitzer *et al.*, 2011), weil sie ausschließlich aus Sca-1⁻ PDCs zusammengesetzt sind.

Neben Ly49Q und CCR9 wurde auch CD9 als ein Oberflächenmarker beschrieben, der funktionell unterschiedliche murine PDC-Subpopulationen identifiziert (Björck *et al.*, 2011). CD9⁺ PDCs sind hauptsächlich im Knochenmark zu finden und produzieren hohe Mengen an IFN-I und weiteren proinflammatorischen Zytokinen, wenn sie mit TLR9-Agonisten stimuliert werden. Im Gegensatz dazu sezernieren CD9⁻ PDCs, die vor allem in der Peripherie vorkommen, kaum IFN-I und proinflammatorische Zytokine. Vielmehr wurden sie in Zusammenhang mit der Induktion von Toleranz gebracht, weil sie FoxP3⁺CD4⁺ regulatorische T-Zellen induzieren (Björck *et al.*, 2011). Auch hier stellte sich die Frage, ob der CD9⁺ Phänotyp dem Sca-1⁻ PDC-Phänotyp entspricht. Um dies zu untersuchen, wurden PDCs aus der Milz und dem Knochenmark aus BALB/c- und C57BL/6-Mäusen isoliert und die CD9-Expression auf PDCs, die gemäß des Phänotyps CD11c^{int}CD45R⁺Ly-6C⁺CD11b⁻ bzw. mPDCA-1⁺Siglec-H⁺ definiert wurden, getestet. Es konnten kaum CD9⁺ PDCs unabhängig von der Färbestrategie der PDCs detektiert werden. Der kleine Anteil an CD9-exprimierenden PDCs zeigte eine ausgeglichene Verteilung von Sca-1⁺ und Sca-1⁻ Zellen. Demnach konnten die Ergebnisse von Björck und Kollegen (Björck *et al.*, 2011) in der vorliegenden Arbeit nicht reproduziert werden. Widersprüchlich zu den beschriebenen Daten exprimierte die CD9⁺ PDC-Subpopulation in Björcks Studien nur partiell den Marker Siglec-H und die Antikörperklone mPDCA-1 und 120G8 zeigten unterschiedliche Färbeergebnisse, obwohl beide Antikörper an das gleiche Epitop von BST2 binden (Björck *et al.*, 2011; Blasius *et al.*, 2006b; Blasius *et al.*, 2006a). An dieser Stelle sei anzumerken, dass Björck genau wie Hadeiba zur Expansion der PDCs *in vivo*, Mäuse mit der Flt3-L-sezernierenden B16-Melanomzelllinie injiziert haben, sodass diese Behandlung auch hier Einfluss auf den PDC-Phänotyp nehmen kann.

Die Rolle von Sca-1 in der PDC-Entwicklung ist bisher nicht bekannt. Sca-1 wird auf hämatopoetischen Stammzellen und auf CD44⁺ Zellen der CD4⁻CD8⁻CD3⁻ Phase 2 Thymozyten exprimiert (Spangrude *et al.*, 1988; Yeh *et al.*, 1986; Bamezai *et al.*, 1995). Die Runterregulation von Sca-1 beim Übergang von Phase 2 zu Phase 3 ist in der Entwicklung der Thymozyten essentiell, da diese ansonsten in der Phase 3 arretieren (Bamezai *et al.*, 1995). Sca-1-überexprimierende T-Zellen zeigen eine verminderte Antwort auf eine TCR-Stimulation, was darauf hindeutet, dass Sca-1 die TCR-vermittelte Signalkaskade beeinflussen kann (Henderson *et al.*, 2002). Es ist denkbar, dass die Runterregulation von Sca-1 auf hämatopoetischen Stammzellen ebenfalls in der Entwicklung der PDCs eine Rolle spielen kann. Interessanterweise konnte für Sca-1 eine Zell-Zell-Interaktion mit einem 66 kDa-großen Glykoprotein, das von dem Antikörper 9AB2 gebunden und sehr wahrscheinlich von Stromazellen exprimiert wird, beobachtet werden (English *et al.*, 2000). Die Regulation der Sca-1-

Expression während der PDC-Entwicklung im Knochenmark und während der Infiltration von sekundären lymphatischen Organen kann somit eine wichtige Rolle in der PDC-Stroma-Adhäsionsinteraktion und in der Besiedlung bzw. dem Verlassen von bestimmten Entwicklungsnischen spielen.

Das räumlich-zeitliche Modell, wie PDCs die angeborene und die erworbene Immunität verbinden, basiert zuerst auf unreifen PDCs, die nach mikrobieller Stimulation große Mengen an IFN-I produzieren, diese Fähigkeit verlieren, in Lymphknoten einwandern und dann zu reifen PDCs differenzieren, die naive T-Zellen stimulieren und die adaptive Immunantwort modulieren können (Soumelis und Liu, 2006). Gemäß den Daten von Björck und Fischer sind PDCs aus den Lymphknoten nicht in der Lage IFN- α zu produzieren (Björck *et al.*, 2011; Fischer, 2008). Diese Zellen scheinen anstelle von Immunität regulatorische Immunantworten zu induzieren (Hadeiba *et al.*, 2008; Björck *et al.*, 2011). Es bleibt fraglich, ob Lymphknoten-PDCs allein von Natur aus tolerogen sind. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass Sca-1⁺ und Sca-1⁻ PDCs vergleichbar auf die CpG-B-abhängige lysosomale TLR9-Stimulation durch die Produktion gleicher Mengen an proinflammatorischen Zytokinen antworteten. Beide Subpopulationen regulierten kostimulatorische Moleküle hoch. Dies ist ein Indiz dafür, dass nicht nur PDCs früherer Entwicklungsstadien, sondern auch PDCs aus der Peripherie in der Lage sind naive T-Zellen zu stimulieren. Folglich hängt auch die Fähigkeit von Lymphknoten-PDCs Toleranz oder Immunität zu induzieren von der Anwesenheit und der Art der Stimulation ab.

Da der lysosomale Signalweg sowohl in Sca-1⁺ als auch in Sca-1⁻ PDCs funktionell ist, kann eine differentielle Expression von TLR9 oder MyD88 die beobachteten Unterschiede im endosomalen TLR9-Signalweg nach CpG-A-Stimulation nicht erklären. Aus diesem Grund muss die unterschiedliche Fähigkeit der Sca-1-Subpopulationen auf endosomale und lysosomale Stimulation zu antworten von einem Faktor unterhalb des TLR9-MyD88-Komplexes abhängen. Microarray-Analysen von Sca-1⁺ und Sca-1⁻ PDCs zeigten, dass Spp1 eins der am höchsten regulierten Gene in beiden Subpopulationen ist. Spp1 kodiert für das Phosphoglykoprotein Osteopontin (Opn), das alternativ translatiert werden kann und unterschiedliche Funktionen entweder als sezerniertes Zytokin (Opn-s) oder als intrazelluläres Protein (Opn-i) im Zytoplasma erfüllt (Shinohara *et al.*, 2005; Shinohara *et al.*, 2008; Miyazaki *et al.*, 2005; Gravalles, 2003; Zohar *et al.*, 2000; Suzuki *et al.*, 2002; Zhu *et al.*, 2004). Shinohara und Kollegen haben Opn-i als den Schlüsselregulator der IFN- α -Produktion in PDCs beschrieben (Shinohara *et al.*, 2006). Opn-i kolokalisiert mit dem TLR9-MyD88-Komplex direkt nach der CpG-A-Stimulation und ist mit der Translokation von IRF-7 in den Nukleus zur Aktivierung der Transkription von IFN- α -Genen assoziiert. Das Ausschalten von Opn-i führte zu einer

Inhibition der IFN- α -Antwort, wohingegen der NF- κ B-abhängige Signalweg zur Produktion von proinflammatorischen Zytokinen nach lysosomaler Stimulation nicht beeinflusst wurde (Shinohara *et al.*, 2006). Eine verminderte Opn-i-Expression in Sca-1⁺ PDCs, die allerdings noch zu beweisen wäre, weil mit Hilfe der Microarray-Analysen und der anschließenden Validierung über qRT-PCR nur das *full-length* Konstrukt detektiert werden konnte, kann somit zu Defekten in der IFN- α -Antwort nach CpG-A-Stimulation führen, ohne die CpG-B-abhängige Produktion von TNF- α , IL-12p70 und IL-6 zu beeinflussen. Opn-i-abhängige Expression von IFN- α in Sca-1⁻ PDCs kann zu ihrer antigenpräsentierenden Aktivität beitragen und Kreuzpräsentation induzieren, so wie es bereits für Gesamt-PDCs aus der Milz, heterogenen DCs *in vitro* und heterogenen Antigen-präsentierenden Zellen *in vivo* gezeigt wurde (Shinohara *et al.*, 2006; Le Bon *et al.*, 2003; Cho *et al.*, 2002; Datta *et al.*, 2003; Heit *et al.*, 2003). Im Gegensatz dazu können Sca-1⁺ PDCs, die eine reduzierte Expression von Opn aufweisen und kaum fähig sind IFN- α nach TLR9-Stimulation zu produzieren, mehr regulatorische Funktionen ausüben.

Im Zusammenhang mit Brustkrebs, wo die Anwesenheit von PDCs mit einer schlechten Prognose korreliert, wurden PDCs mit einer supprimierenden Funktion beschrieben (Treilleux *et al.*, 2004). Tumor-assoziierte (TA)-PDCs sind schwache IFN- α -Produzenten und kolokalisieren mit FoxP3⁺-regulatorischen T-Zellen, um ihre Expansion zu fördern. Die regulatorischen Kapazitäten der TA-PDCs waren stark von ihrer eingeschränkten Fähigkeit zur IFN- α -Produktion abhängig und konnten durch die Zugabe von exogenen IFN- α aufgehoben werden (Sisirak *et al.*, 2012). Gemäß den hier vorliegenden Ergebnissen könnte man darüber spekulieren, dass Gewebe-spezifische Faktoren in sekundären lymphoiden Organen die Umkehrung von IFN- α -produzierenden Sca-1⁻ PDCs in Sca-1⁺ PDCs kontrollieren können. Die Identifikation solcher Faktoren und darüber hinaus die Identifikation des humanen Gegenstücks des murinen Sca-1-Rezeptors, das genauso die Existenz funktionell unterschiedlicher PDC-Subpopulationen im Menschen beweist, kann nicht nur Aufschluss darüber geben, wie beide Subpopulationen unter *steady-state* Bedingungen reguliert werden, sondern auch welche Mechanismen Krebs zur Immunflucht verhelfen.

4.3 Ausblick

Die Identifikation von terminalen asialo Galactosyl-Oligosacchariden in einem Biantennenkomplex als Liganden von CD303, einem C-Typ-Lektin humaner PDCs, eröffnet neue Forschungsmöglichkeiten zur Spezifikation der Träger dieser Zuckermodifikationen. So kann geprüft werden, ob die Bindung von CD303 zu bereits beschriebenen CD303L wie dem HIV-Hüllprotein gp120 und HBsAg, das im Plasma von Hepatitis B-Patienten detektiert wurde, über die oben definierte Glykosylierung der Proteine vermittelt wird. Eine intensive Untersuchung des Oberflächenglykoproteoms von CD303L⁺ Zelllinien und Primärzellen mit Hilfe von Glykomics könnte zur Identifikation der spezifischen Proteine führen, die eine terminale asialo-Galactosyl-Modifikation tragen. Im Falle der Krebszelllinien könnten diese Proteine als potentielle Biomarker definiert werden, die eine Dysregulation von PDCs verursachen können.

Eine Maskierung der Galactose-Einheiten durch Sialinsäure inhibiert die Bindung des Liganden an CD303. Es ist durchaus denkbar, dass in diesem Zusammenhang eine Runterregulation, ein Defekt oder eine Fehlfunktion von Enzymen, die Sialinsäuren von Zuckerketten entfernen (Sialidase, Transsialidase) oder Sialinsäuren abbauen (O-Acetylerase, Sialat-Pyruvat-Lyase), in Autoimmunerkrankungen eine wichtige Rolle spielen können, da die Entfernung oder der Abbau der Sialinsäure von Galactose-Resten essentiell für die Bindung an CD303 und der damit verbundenen Inhibition der IFN- α -Produktion in PDCs ist. Die Untersuchung dieser Enzyme in SLE- oder Psoriasis-Patienten könnte zur Klärung dieser Hypothese beitragen. Ebenso wäre es interessant zu überprüfen, ob der Ligandennachweis mit Hilfe von rCD303 auf Monozyten von SLE-Patienten im Vergleich zur gesunden Kontrolle nicht mehr erbracht werden könnte. Man würde erwarten, dass die Monozyten aus SLE-Patienten ihre Inhibitionsfähigkeit im Kokulturanatz mit aktivierten PDCs und dadurch die Kontrolle über die IFN- α -Ausschüttung durch PDCs verlieren.

Als ein wichtiger Regulator der IFN- α -Produktion wurde Osteopontin (Opn, Spp1) beschrieben. In Mäusen konnte gezeigt werden, dass nur die intrazelluläre Isoform von Opn die Expression der IFN-Gene in einer TLR9-abhängigen Aktivierung beeinflusst. Ein eindeutiger Beweis für die Existenz dieser Isoform in Sca-1⁻ PDCs könnte die funktionelle Heterogenität der Sca-1⁺ und Sca-1⁻ PDCs nach endosomaler TLR9-Stimulation erklären. Da die Generierung der intrazellulären und der sezernierten Isoform von Opn auf alternativer Translation basiert, müsste der Nachweis auf Proteinebene z.B. durch fluoreszenz-mikroskopische Untersuchungen erfolgen. Falls diese Annahme bestätigt werden würde, stellt sich die Frage, ob Sca-1⁺ PDCs dann durch die Expression exogener Spp1-mRNA die Fähigkeit zur verstärkten IFN- α -Produktion erlangen können. Es wäre auch interessant zu überprüfen,

ob diese Zellen tolerogene Eigenschaften aufweisen. Ein Vergleich der T-Zell-Aktivierung in Kokultorexperimenten und der Fähigkeit zur Antigenpräsentation mit der Sca-1⁺ Subpopulation, die primär IFN- α -vermittelte Immunantworten auslöst, könnte mehr Aufschluss darüber geben.

5. Zusammenfassung

CD303 ist ein transmembranes Glykoprotein, welches zur Dectin-2-Familie der Typ II Calcium-abhängigen C-Typ-Lektine gehört, und wird spezifisch auf humanen plasmazytoiden dendritischen Zellen (PDCs) exprimiert. CD303 interagiert mit der Fc ϵ R γ -Kette, wodurch es Funktionen eines Signalrezeptors ausübt. Die Bindung eines CD303-spezifischen Antikörpers induziert ein B-Zell-ähnliches Signalosom, welches zur Inhibition der Interferon- α (IFN- α)-Produktion in humanen PDCs führt. Eine unkontrollierte IFN- α -Ausschüttung wird in vielen Autoimmunerkrankungen wie systemischer Lupus erythematosus (SLE) oder Psoriasis als hauptsächlicher pathophysiologischer Faktor angesehen. Die Inhibition der IFN- α -Sekretion kann in diesem Zusammenhang ein wichtiges therapeutisches Mittel gegen Autoimmunerkrankungen sein. Die Isolation und Identifikation eines natürlichen endogenen CD303-Liganden (CD303L) kann folglich neue Erkenntnisse über die Regulation von CD303 und die Funktion von PDCs in der Autoimmunität bringen und war ein Ziel dieser Arbeit.

Die Herstellung eines rekombinanten CD303-Fusionsproteins führte zunächst zur Definition von CD303L⁺ Zelllinien und Primärzellen, wobei Krebszelllinien, Monozyten und B-Zellen als Träger des auf der Zelloberfläche lokalisierten CD303L identifiziert werden konnten. Klassische Immunpräzipitationsexperimente und die Durchführung der optimierten *Ligand-based Receptor Capturing* (LRC)-Technologie resultierten in Vorschlägen von Kandidaten für den CD303L. Allerdings konnten sowohl GAPDH als auch CD222 in anschließenden Validierungsexperimenten nicht als CD303L bestätigt werden. Zellbasierte Funktionalitätsanalysen konnten mit Hilfe der A95-KK NFAT-GFP-Reporterzelllinie ebenso keinen funktionellen CD303L identifizieren. Mit diesem artifiziellen System konnte weiterhin die Funktionalität des Humanen Immundefizienz-Virus (HIV)-Hüllproteins gp120, welches als ein funktioneller Ligand von CD303 beschrieben und für CD303 dadurch eine Rolle als Pathogenrezeptor vorgeschlagen wurde, im Verbund von HIV-1-Partikeln nicht bestätigt werden.

Zwar konnte gezeigt werden, dass die Bindung von rCD303 an seinen Liganden unabhängig von den Zuckermodifikationen des rekombinanten Proteins war, jedoch brachte erst die Studie von Riboldi und Kollegen im Jahre 2011 Gewissheit über die Identität des Liganden, der als asialo Galactosyl-Oligosaccharid endständiger Position eines Biantennenkomplexes identifiziert wurde.

Die Regulation der IFN- α -Produktion in PDCs kann auf unterschiedlichen Mechanismen basieren. Die Fähigkeit der PDCs auf bestimmte Antigene zu antworten, kann sowohl von der Art der Stimulation aber auch von der Existenz verschiedener PDC-Subpopulationen abhängen. Der Stammzellmarker Sca-1 (*stem cell antigen-1*) wurde als ein Marker, der differen-

tiell in murinen PDCs exprimiert wird, identifiziert. Eine funktionelle Analyse der Sca-1⁺ und Sca-1⁻ Subpopulationen war das Ziel des zweiten Projektes dieser Arbeit.

Es konnte bestätigt werden, dass die Sca-1-Expression unterschiedliche Entwicklungsstadien von PDCs definiert. Sca-1⁻ PDCs zeigten dabei einen Vorläufer-Phänotyp. Sie wiesen eine erhöhte Proliferationsaktivität auf und residierten primär im Knochenmark, während Sca-1⁺ PDCs durch eine verstärkte Expression von MHC-II-Molekülen eher einen reiferen Phänotyp repräsentierten und mit hohen Frequenzen in den Lymphknoten zu finden waren. Repopulationsuntersuchungen in der CD303-Diphtherietoxin-Rezeptor transgenen Maus, in der durch die Zugabe von Diphtherietoxin alle endogenen PDCs depletiert werden konnten, zeigten, dass sich zuerst Sca-1⁻ PDCs und nachfolgend Sca-1⁺ PDCs entwickelten. Die Regulation der Sca-1-Expression erfolgte dabei durch lokale Faktoren des Mikromilieus des jeweiligen Organs. Die Sca-1-Expression konnte durch eine TLR7/9-abhängige Aktivierung der Zellen induziert werden. Die Stimulation mit dem endosomalen TLR9-Liganden CpG-A zeigte eine Heterogenität der Zellen in ihrer Fähigkeit zur IFN- α -Produktion. Sca-1⁺ PDCs produzierten geringe Mengen an IFN- α verglichen mit Sca-1⁻ Zellen, die folglich als die wahren natürlichen IFN- α -Produzenten identifiziert wurden. Interessanterweise war diese Diskrepanz nach lysosomaler TLR9-Stimulation der Zellen mit CpG-B in der Produktion proinflammatorischer Zytokine nicht detektierbar. Um die molekularen Mechanismen, die zur funktionellen Heterogenität der Sca-1-Subpopulationen nach endosomaler, aber nicht lysosomaler TLR9-Stimulation führten, zu ermitteln, wurden Microarray-Analysen mit sortierten Sca-1⁺ und Sca-1⁻ PDCs durchgeführt. Die Ergebnisse zeigten, dass Osteopontin (Opn) stark in Sca-1⁻ PDCs hochreguliert war. Literaturhinweise belegen, dass die intrazelluläre Isoform von Opn den endosomalen TLR9-Signalweg mit der IFN- α -Produktion koppelt, wodurch die funktionelle Heterogenität der beiden Sca-1-Subpopulationen erklärt werden könnte.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass die Regulation der IFN- α -Produktion in PDCs entscheidend für die Funktion der Zellen unter normalen und pathologischen Bedingungen ist. Sowohl im humanen als auch im murinen System gibt es Mechanismen, die die Fähigkeit der IFN- α -Produktion in PDCs modulieren können. Eine spezifische Interaktion des humanen PDC-Rezeptors CD303 mit putativen Liganden, die endständige asialo Galactosyl-Oligosaccharide tragen, aber ebenso der Einfluss lokaler Faktoren, die zur Veränderungen des murinen PDC-Phänotyps führen, können die Produktion von IFN- α in PDCs reduzieren oder sogar komplett inhibieren.

6. Literaturverzeichnis

- Aarnoudse, C.A., Garcia Vallejo, J.J., Saeland, E., and van Kooyk, Y. (2006). Recognition of tumor glycans by antigen-presenting cells. *Curr Opin Immunol* 18, 105-111.
- Abts, H., Emmerich, M., Miltenyi, S., Radbruch, A., and Tesch, H. (1989). CD20 positive human B lymphocytes separated with the magnetic cell sorter (MACS) can be induced to proliferation and antibody secretion in vitro. *Journal of immunological methods* 125, 19-28.
- Akira, S., and Takeda, K. (2004). Toll-like receptor signalling. *Nature reviews* 4, 499-511.
- Appelmelk, B.J., van Die, I., van Vliet, S.J., Vandenbroucke-Grauls, C.M., Geijtenbeek, T.B., and van Kooyk, Y. (2003). Cutting edge: carbohydrate profiling identifies new pathogens that interact with dendritic cell-specific ICAM-3-grabbing nonintegrin on dendritic cells. *J Immunol* 170, 1635-1639.
- Arce, I., Roda-Navarro, P., Montoya, M.C., Hernanz-Falcon, P., Puig-Kroger, A., and Fernandez-Ruiz, E. (2001). Molecular and genomic characterization of human DLEC, a novel member of the C-type lectin receptor gene family preferentially expressed on monocyte-derived dendritic cells. *European journal of immunology* 31, 2733-2740.
- Asselin-Paturel, C., Boonstra, A., Dalod, M., Durand, I., Yessaad, N., Dezutter-Dambuyant, C., Vicari, A., O'Garra, A., Biron, C., Briere, F., and Trinchieri, G. (2001). Mouse type I IFN-producing cells are immature APCs with plasmacytoid morphology. *Nature immunology* 2, 1144-1150.
- Asselin-Paturel, C., Brizard, G., Chemin, K., Boonstra, A., O'Garra, A., Vicari, A., and Trinchieri, G. (2005). Type I interferon dependence of plasmacytoid dendritic cell activation and migration. *The Journal of experimental medicine* 201, 1157-1167.
- Asselin-Paturel, C., Brizard, G., Pin, J.J., Briere, F., and Trinchieri, G. (2003). Mouse strain differences in plasmacytoid dendritic cell frequency and function revealed by a novel monoclonal antibody. *J Immunol* 171, 6466-6477.
- Baccala, R., Hoebe, K., Kono, D.H., Beutler, B., and Theofilopoulos, A.N. (2007). TLR-dependent and TLR-independent pathways of type I interferon induction in systemic autoimmunity. *Nature medicine* 13, 543-551.
- Baechler, E.C., Gregersen, P.K., and Behrens, T.W. (2004). The emerging role of interferon in human systemic lupus erythematosus. *Curr Opin Immunol* 16, 801-807.
- Bamezai, A., Palliser, D., Berezovskaya, A., McGrew, J., Higgins, K., Lacy, E., and Rock, K.L. (1995). Regulated expression of Ly-6A.2 is important for T cell development. *J Immunol* 154, 4233-4239.
- Banchereau, J., Briere, F., Caux, C., Davoust, J., Lebecque, S., Liu, Y.J., Pulendran, B., and Palucka, K. (2000). Immunobiology of dendritic cells. *Annual review of immunology* 18, 767-811.
- Barrow, A.D., and Trowsdale, J. (2006). You say ITAM and I say ITIM, let's call the whole thing off: the ambiguity of immunoreceptor signalling. *European journal of immunology* 36, 1646-1653.
- Barry, M., and Bleackley, R.C. (2002). Cytotoxic T lymphocytes: all roads lead to death. *Nature reviews* 2, 401-409.
- Bekeredjian-Ding, I., Schafer, M., Hartmann, E., Pries, R., Parcina, M., Schneider, P., Giese, T., Endres, S., Wollenberg, B., and Hartmann, G. (2009). Tumour-derived prostaglandin E and transforming growth factor-beta synergize to inhibit plasmacytoid dendritic cell-derived interferon-alpha. *Immunology* 128, 439-450.
- Berinstein, N.L. (2002). Carcinoembryonic antigen as a target for therapeutic anticancer vaccines: a review. *J Clin Oncol* 20, 2197-2207.
- Biron, C.A., Nguyen, K.B., Pien, G.C., Cousens, L.P., and Salazar-Mather, T.P. (1999). Natural killer cells in antiviral defense: function and regulation by innate cytokines. *Annual review of immunology* 17, 189-220.

- Björck, P., Leong, H.X., and Engleman, E.G. (2011). Plasmacytoid dendritic cell dichotomy: identification of IFN- α producing cells as a phenotypically and functionally distinct subset. *J Immunol* 186, 1477-1485.
- Blanco, P., Palucka, A.K., Gill, M., Pascual, V., and Banchereau, J. (2001). Induction of dendritic cell differentiation by IFN- α in systemic lupus erythematosus. *Science* (New York, N.Y. 294, 1540-1543.
- Blasius, A.L., Cella, M., Maldonado, J., Takai, T., and Colonna, M. (2006a). Siglec-H is an IPC-specific receptor that modulates type I IFN secretion through DAP12. *Blood* 107, 2474-2476.
- Blasius, A.L., Giurisato, E., Cella, M., Schreiber, R.D., Shaw, A.S., and Colonna, M. (2006b). Bone marrow stromal cell antigen 2 is a specific marker of type I IFN-producing cells in the naïve mouse, but a promiscuous cell surface antigen following IFN stimulation. *J Immunol* 177, 3260-3265.
- Blomberg, S., Eloranta, M.L., Cederblad, B., Nordlin, K., Alm, G.V., and Ronnblom, L. (2001). Presence of cutaneous interferon- α producing cells in patients with systemic lupus erythematosus. *Lupus* 10, 484-490.
- Bogoevska, V., Horst, A., Klampe, B., Lucka, L., Wagener, C., and Nollau, P. (2006). CEACAM1, an adhesion molecule of human granulocytes, is fucosylated by fucosyltransferase IX and interacts with DC-SIGN of dendritic cells via Lewis x residues. *Glycobiology* 16, 197-209.
- Bogoevska, V., Nollau, P., Lucka, L., Grunow, D., Klampe, B., Uotila, L.M., Samsen, A., Gahmberg, C.G., and Wagener, C. (2007). DC-SIGN binds ICAM-3 isolated from peripheral human leukocytes through Lewis x residues. *Glycobiology* 17, 324-333.
- Bot, A., Bot, S., Antohi, S., Karjalainen, K., and Bona, C. (1996). Kinetics of generation and persistence on membrane class II molecules of a viral peptide expressed on foreign and self proteins. *J Immunol* 157, 3436-3442.
- Brown, G.D., and Gordon, S. (2001). Immune recognition. A new receptor for beta-glucans. *Nature* 413, 36-37.
- Brown, G.D., Herre, J., Williams, D.L., Willment, J.A., Marshall, A.S., and Gordon, S. (2003). Dectin-1 mediates the biological effects of beta-glucans. *The Journal of experimental medicine* 197, 1119-1124.
- Burgdorf, S., Kautz, A., Bohnert, V., Knolle, P.A., and Kurts, C. (2007). Distinct pathways of antigen uptake and intracellular routing in CD4 and CD8 T cell activation. *Science* (New York, N.Y. 316, 612-616.
- Burkett, P.R., Koka, R., Chien, M., Chai, S., Boone, D.L., and Ma, A. (2004). Coordinate expression and trans presentation of interleukin (IL)-15 α and IL-15 supports natural killer cell and memory CD8 $^{+}$ T cell homeostasis. *The Journal of experimental medicine* 200, 825-834.
- Camargo, J.F., Quinones, M.P., Mummidi, S., Srinivas, S., Gaitan, A.A., Begum, K., Jimenez, F., VanCompernelle, S., Unutmaz, D., Ahuja, S.S., and Ahuja, S.K. (2009). CCR5 expression levels influence NFAT translocation, IL-2 production, and subsequent signaling events during T lymphocyte activation. *J Immunol* 182, 171-182.
- Cambi, A., and Figdor, C.G. (2003). Dual function of C-type lectin-like receptors in the immune system. *Curr Opin Cell Biol* 15, 539-546.
- Cambi, A., Koopman, M., and Figdor, C.G. (2005). How C-type lectins detect pathogens. *Cell Microbiol* 7, 481-488.
- Cambi, A., Netea, M.G., Mora-Montes, H.M., Gow, N.A., Hato, S.V., Lowman, D.W., Kullberg, B.J., Torensma, R., Williams, D.L., and Figdor, C.G. (2008). Dendritic cell interaction with *Candida albicans* critically depends on N-linked mannan. *The Journal of biological chemistry* 283, 20590-20599.
- Cao, W., Bover, L., Cho, M., Wen, X., Hanabuchi, S., Bao, M., Rosen, D.B., Wang, Y.H., Shaw, J.L., Du, Q., *et al.* (2009). Regulation of TLR7/9 responses in plasmacytoid

- dendritic cells by BST2 and ILT7 receptor interaction. *The Journal of experimental medicine* 206, 1603-1614.
- Cao, W., Rosen, D.B., Ito, T., Bover, L., Bao, M., Watanabe, G., Yao, Z., Zhang, L., Lanier, L.L., and Liu, Y.J. (2006). Plasmacytoid dendritic cell-specific receptor ILT7-Fc epsilonRI gamma inhibits Toll-like receptor-induced interferon production. *The Journal of experimental medicine* 203, 1399-1405.
- Cao, W., Zhang, L., Rosen, D.B., Bover, L., Watanabe, G., Bao, M., Lanier, L.L., and Liu, Y.J. (2007). BDCA2/Fc epsilon RI gamma complex signals through a novel BCR-like pathway in human plasmacytoid dendritic cells. *PLoS Biol* 5, e248.
- Cella, M., Jarrossay, D., Facchetti, F., Alebardi, O., Nakajima, H., Lanzavecchia, A., and Colonna, M. (1999). Plasmacytoid monocytes migrate to inflamed lymph nodes and produce large amounts of type I interferon. *Nature medicine* 5, 919-923.
- Cella, M., Scheidegger, D., Palmer-Lehmann, K., Lane, P., Lanzavecchia, A., and Alber, G. (1996). Ligation of CD40 on dendritic cells triggers production of high levels of interleukin-12 and enhances T cell stimulatory capacity: T-T help via APC activation. *The Journal of experimental medicine* 184, 747-752.
- Cho, H.J., Hayashi, T., Datta, S.K., Takabayashi, K., Van Uden, J.H., Horner, A., Corr, M., and Raz, E. (2002). IFN-alpha beta promote priming of antigen-specific CD8+ and CD4+ T lymphocytes by immunostimulatory DNA-based vaccines. *J Immunol* 168, 4907-4913.
- Clark, D., and Mao, L. (2012). Cancer biomarker discovery: lectin-based strategies targeting glycoproteins. *Disease markers* 33, 1-10.
- Clynes, R., Maizes, J.S., Guinamard, R., Ono, M., Takai, T., and Ravetch, J.V. (1999). Modulation of immune complex-induced inflammation in vivo by the coordinate expression of activation and inhibitory Fc receptors. *The Journal of experimental medicine* 189, 179-185.
- Codias, E.K., Cray, C., Baler, R.D., Levy, R.B., and Malek, T.R. (1989). Expression of Ly-6A/E alloantigens in thymocyte and T-lymphocyte subsets: variability related to the Ly-6a and Ly-6b haplotypes. *Immunogenetics* 29, 98-107.
- Correa, C.R., Bertollo, C.M., Zouain, C.S., and Goes, A.M. (2010). Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase as a surface associated antigen on human breast cancer cell lines MACL-1 and MGSO-3. *Oncology reports* 24, 677-685.
- Dalod, M., Hamilton, T., Salomon, R., Salazar-Mather, T.P., Henry, S.C., Hamilton, J.D., and Biron, C.A. (2003). Dendritic cell responses to early murine cytomegalovirus infection: subset functional specialization and differential regulation by interferon alpha/beta. *The Journal of experimental medicine* 197, 885-898.
- Datta, S.K., Redecke, V., Prilliman, K.R., Takabayashi, K., Corr, M., Tallant, T., DiDonato, J., Dziarski, R., Akira, S., Schoenberger, S.P., and Raz, E. (2003). A subset of Toll-like receptor ligands induces cross-presentation by bone marrow-derived dendritic cells. *J Immunol* 170, 4102-4110.
- de Witte, L., Nabatov, A., Pion, M., Fluitsma, D., de Jong, M.A., de Gruijl, T., Piguet, V., van Kooyk, Y., and Geijtenbeek, T.B. (2007). Langerin is a natural barrier to HIV-1 transmission by Langerhans cells. *Nature medicine* 13, 367-371.
- Denda-Nagai, K., and Irimura, T. (2000). MUC1 in carcinoma-host interactions. *Glycoconj J* 17, 649-658.
- Diebold, S.S., Kaisho, T., Hemmi, H., Akira, S., and Reis e Sousa, C. (2004). Innate antiviral responses by means of TLR7-mediated recognition of single-stranded RNA. *Science (New York, N.Y)* 303, 1529-1531.
- Ding, C., Cai, Y., Marroquin, J., Ildstad, S.T., and Yan, J. (2009). Plasmacytoid dendritic cells regulate autoreactive B cell activation via soluble factors and in a cell-to-cell contact manner. *J Immunol* 183, 7140-7149.

- Diveu, C., McGeachy, M.J., Boniface, K., Stumhofer, J.S., Sathe, M., Joyce-Shaikh, B., Chen, Y., Tato, C.M., McClanahan, T.K., de Waal Malefyt, R., *et al.* (2009). IL-27 blocks RORc expression to inhibit lineage commitment of Th17 cells. *J Immunol* 182, 5748-5756.
- Douagi, I., Gujer, C., Sundling, C., Adams, W.C., Smed-Sorensen, A., Seder, R.A., Karlsson Hedestam, G.B., and Lore, K. (2009). Human B cell responses to TLR ligands are differentially modulated by myeloid and plasmacytoid dendritic cells. *J Immunol* 182, 1991-2001.
- Drickamer, K. (1992). Engineering galactose-binding activity into a C-type mannose-binding protein. *Nature* 360, 183-186.
- Drickamer, K. (1999). C-type lectin-like domains. *Current opinion in structural biology* 9, 585-590.
- Drickamer, K., and Fadden, A.J. (2002). Genomic analysis of C-type lectins. *Biochem Soc Symp*, 59-72.
- Dumont, F.J., and Coker, L.Z. (1986). Interferon-alpha/beta enhances the expression of Ly-6 antigens on T cells in vivo and in vitro. *European journal of immunology* 16, 735-740.
- Dumont, F.J., Dijkmans, R., Palfree, R.G., Boltz, R.D., and Coker, L. (1987). Selective up-regulation by interferon-gamma of surface molecules of the Ly-6 complex in resting T cells: the Ly-6A/E and TAP antigens are preferentially enhanced. *European journal of immunology* 17, 1183-1191.
- Dzionic, A., Fuchs, A., Schmidt, P., Cremer, S., Zysk, M., Miltenyi, S., Buck, D.W., and Schmitz, J. (2000). BDCA-2, BDCA-3, and BDCA-4: three markers for distinct subsets of dendritic cells in human peripheral blood. *J Immunol* 165, 6037-6046.
- Dzionic, A., Sohma, Y., Nagafune, J., Cella, M., Colonna, M., Facchetti, F., Gunther, G., Johnston, I., Lanzavecchia, A., Nagasaka, T., *et al.* (2001). BDCA-2, a novel plasmacytoid dendritic cell-specific type II C-type lectin, mediates antigen capture and is a potent inhibitor of interferon alpha/beta induction. *The Journal of experimental medicine* 194, 1823-1834.
- English, A., Kosoy, R., Pawlinski, R., and Bamezai, A. (2000). A monoclonal antibody against the 66-kDa protein expressed in mouse spleen and thymus inhibits Ly-6A.2-dependent cell-cell adhesion. *J Immunol* 165, 3763-3771.
- Fabricius, D., Neubauer, M., Mandel, B., Schutz, C., Viardot, A., Vollmer, A., Jahrsdorfer, B., and Debatin, K.M. (2010). Prostaglandin E2 inhibits IFN-alpha secretion and Th1 costimulation by human plasmacytoid dendritic cells via E-prostanoid 2 and E-prostanoid 4 receptor engagement. *J Immunol* 184, 677-684.
- Facchetti, F., De Wolf-Peters, C., van den Oord, J.J., De vos, R., and Desmet, V.J. (1988). Plasmacytoid T cells: a cell population normally present in the reactive lymph node. An immunohistochemical and electronmicroscopic study. *Hum Pathol* 19, 1085-1092.
- Farkas, L., Beiske, K., Lund-Johansen, F., Brandtzaeg, P., and Jahnsen, F.L. (2001). Plasmacytoid dendritic cells (natural interferon- alpha/beta-producing cells) accumulate in cutaneous lupus erythematosus lesions. *Am J Pathol* 159, 237-243.
- Feinberg, H., Taylor, M.E., and Weis, W.I. (2007). Scavenger receptor C-type lectin binds to the leukocyte cell surface glycan Lewis(x) by a novel mechanism. *The Journal of biological chemistry* 282, 17250-17258.
- Feldman, S.B., Milone, M.C., Kloser, P., and Fitzgerald-Bocarsly, P. (1995). Functional deficiencies in two distinct interferon alpha-producing cell populations in peripheral blood mononuclear cells from human immunodeficiency virus seropositive patients. *J Leukoc Biol* 57, 214-220.
- Fernandes, M.J., Iscove, N.N., Gingras, G., and Calabretta, B. (2000). Identification and characterization of the gene for a novel C-type lectin (CLECSF7) that maps near the natural killer gene complex on human chromosome 12. *Genomics* 69, 263-270.

- Field, J., Nikawa, J., Broek, D., MacDonald, B., Rodgers, L., Wilson, I.A., Lerner, R.A., and Wigler, M. (1988). Purification of a RAS-responsive adenylyl cyclase complex from *Saccharomyces cerevisiae* by use of an epitope addition method. *Mol Cell Biol* 8, 2159-2165.
- Figdor, C.G., van Kooyk, Y., and Adema, G.J. (2002). C-type lectin receptors on dendritic cells and Langerhans cells. *Nature reviews* 2, 77-84.
- Fischer, J.A.A. (2008). Identification and functional characterization of mPDCA-1 as a novel antigen-uptake receptor on murine plasmacytoid dendritic cells enabling (cross-) priming of naive CD4+ and CD8+ T cells. In Research and Development, Miltenyi Biotec GmbH (Bergisch Gladbach).
- Fitzgerald-Bocarsly, P. (1993). Human natural interferon-alpha producing cells. *Pharmacol Ther* 60, 39-62.
- Flanagan, M.L., Arias, R.S., Hu, P., Khawli, L.A., and Epstein, A.L. (2007). Soluble Fc fusion proteins for biomedical research. *Methods Mol Biol* 378, 33-52.
- Fleming, T.J., O'HUigin, C., and Malek, T.R. (1993). Characterization of two novel Ly-6 genes. Protein sequence and potential structural similarity to alpha-bungarotoxin and other neurotoxins. *J Immunol* 150, 5379-5390.
- Frei, A.P., Jeon, O.Y., Kilcher, S., Moest, H., Henning, L.M., Jost, C., Pluckthun, A., Mercer, J., Aebersold, R., Carreira, E.M., and Wollscheid, B. (2012). Direct identification of ligand-receptor interactions on living cells and tissues. *Nature biotechnology*.
- Fujikado, N., Saijo, S., Yonezawa, T., Shimamori, K., Ishii, A., Sugai, S., Kotaki, H., Sudo, K., Nose, M., and Iwakura, Y. (2008). Dcir deficiency causes development of autoimmune diseases in mice due to excess expansion of dendritic cells. *Nature medicine* 14, 176-180.
- Fukuda, M., Hiraoka, N., and Yeh, J.C. (1999). C-type lectins and sialyl Lewis X oligosaccharides. Versatile roles in cell-cell interaction. *The Journal of cell biology* 147, 467-470.
- Galiana-Arnoux, D., and Imler, J.L. (2006). Toll-like receptors and innate antiviral immunity. *Tissue Antigens* 67, 267-276.
- Gantner, B.N., Simmons, R.M., Canavera, S.J., Akira, S., and Underhill, D.M. (2003). Collaborative induction of inflammatory responses by dectin-1 and Toll-like receptor 2. *The Journal of experimental medicine* 197, 1107-1117.
- Garcia-Vallejo, J.J., and van Kooyk, Y. (2009). Endogenous ligands for C-type lectin receptors: the true regulators of immune homeostasis. *Immunol Rev* 230, 22-37.
- Garcia-Vallejo, J.J., van Liempt, E., da Costa Martins, P., Beckers, C., van het Hof, B., Gringhuis, S.I., Zwaginga, J.J., van Dijk, W., Geijtenbeek, T.B., van Kooyk, Y., and van Die, I. (2008). DC-SIGN mediates adhesion and rolling of dendritic cells on primary human umbilical vein endothelial cells through LewisY antigen expressed on ICAM-2. *Molecular immunology* 45, 2359-2369.
- Geijtenbeek, T.B., Krooshoop, D.J., Bleijs, D.A., van Vliet, S.J., van Duijnhoven, G.C., Grabovsky, V., Alon, R., Figdor, C.G., and van Kooyk, Y. (2000a). DC-SIGN-ICAM-2 interaction mediates dendritic cell trafficking. *Nature immunology* 1, 353-357.
- Geijtenbeek, T.B., Kwon, D.S., Torensma, R., van Vliet, S.J., van Duijnhoven, G.C., Middel, J., Cornelissen, I.L., Nottet, H.S., KewalRamani, V.N., Littman, D.R., *et al.* (2000b). DC-SIGN, a dendritic cell-specific HIV-1-binding protein that enhances trans-infection of T cells. *Cell* 100, 587-597.
- Geijtenbeek, T.B., Torensma, R., van Vliet, S.J., van Duijnhoven, G.C., Adema, G.J., van Kooyk, Y., and Figdor, C.G. (2000c). Identification of DC-SIGN, a novel dendritic cell-specific ICAM-3 receptor that supports primary immune responses. *Cell* 100, 575-585.

- Geijtenbeek, T.B., van Vliet, S.J., Engering, A., t Hart, B.A., and van Kooyk, Y. (2004). Self- and nonself-recognition by C-type lectins on dendritic cells. *Annual review of immunology* 22, 33-54.
- Geijtenbeek, T.B., Van Vliet, S.J., Koppel, E.A., Sanchez-Hernandez, M., Vandenbroucke-Grauls, C.M., Appelmelk, B., and Van Kooyk, Y. (2003). Mycobacteria target DC-SIGN to suppress dendritic cell function. *The Journal of experimental medicine* 197, 7-17.
- Ghanekar, Y., Chandrashaker, A., Tatu, U., and Visweswariah, S.S. (2004). Glycosylation of the receptor guanylate cyclase C: role in ligand binding and catalytic activity. *Biochem J* 379, 653-663.
- Gilliet, M., Boonstra, A., Paturel, C., Antonenko, S., Xu, X.L., Trinchieri, G., O'Garra, A., and Liu, Y.J. (2002). The development of murine plasmacytoid dendritic cell precursors is differentially regulated by FLT3-ligand and granulocyte/macrophage colony-stimulating factor. *The Journal of experimental medicine* 195, 953-958.
- Gilliet, M., Cao, W., and Liu, Y.J. (2008). Plasmacytoid dendritic cells: sensing nucleic acids in viral infection and autoimmune diseases. *Nature reviews* 8, 594-606.
- Grabbe, S., Kampgen, E., and Schuler, G. (2000). Dendritic cells: multi-lineal and multi-functional. *Immunol Today* 21, 431-433.
- Graham, L.M., and Brown, G.D. (2009). The Dectin-2 family of C-type lectins in immunity and homeostasis. *Cytokine* 48, 148-155.
- Gravallese, E.M. (2003). Osteopontin: a bridge between bone and the immune system. *The Journal of clinical investigation* 112, 147-149.
- Grouard, G., Rissoan, M.C., Filgueira, L., Durand, I., Banchereau, J., and Liu, Y.J. (1997). The enigmatic plasmacytoid T cells develop into dendritic cells with interleukin (IL)-3 and CD40-ligand. *The Journal of experimental medicine* 185, 1101-1111.
- Grundy, M.A., Zhang, T., and Sentman, C.L. (2007). NK cells rapidly remove B16F10 tumor cells in a perforin and interferon-gamma independent manner in vivo. *Cancer Immunol Immunother* 56, 1153-1161.
- Guiducci, C., Ott, G., Chan, J.H., Damon, E., Calacsan, C., Matray, T., Lee, K.D., Coffman, R.L., and Barrat, F.J. (2006). Properties regulating the nature of the plasmacytoid dendritic cell response to Toll-like receptor 9 activation. *The Journal of experimental medicine* 203, 1999-2008.
- Haagsman, H.P., Hawgood, S., Sargeant, T., Buckley, D., White, R.T., Drickamer, K., and Benson, B.J. (1987). The major lung surfactant protein, SP 28-36, is a calcium-dependent, carbohydrate-binding protein. *The Journal of biological chemistry* 262, 13877-13880.
- Hadeiba, H., Sato, T., Habtezion, A., Oderup, C., Pan, J., and Butcher, E.C. (2008). CCR9 expression defines tolerogenic plasmacytoid dendritic cells able to suppress acute graft-versus-host disease. *Nature immunology* 9, 1253-1260.
- Heil, F., Hemmi, H., Hochrein, H., Ampenberger, F., Kirschning, C., Akira, S., Lipford, G., Wagner, H., and Bauer, S. (2004). Species-specific recognition of single-stranded RNA via toll-like receptor 7 and 8. *Science (New York, N.Y)* 303, 1526-1529.
- Heit, A., Maurer, T., Hochrein, H., Bauer, S., Huster, K.M., Busch, D.H., and Wagner, H. (2003). Cutting edge: Toll-like receptor 9 expression is not required for CpG DNA-aided cross-presentation of DNA-conjugated antigens but essential for cross-priming of CD8 T cells. *J Immunol* 170, 2802-2805.
- Henderson, S.C., Kamdar, M.M., and Bamezai, A. (2002). Ly-6A.2 expression regulates antigen-specific CD4+ T cell proliferation and cytokine production. *J Immunol* 168, 118-126.
- Honda, K., Ohba, Y., Yanai, H., Negishi, H., Mizutani, T., Takaoka, A., Taya, C., and Taniguchi, T. (2005a). Spatiotemporal regulation of MyD88-IRF-7 signalling for robust type-I interferon induction. *Nature* 434, 1035-1040.

- Honda, K., Sakaguchi, S., Nakajima, C., Watanabe, A., Yanai, H., Matsumoto, M., Ohteki, T., Kaisho, T., Takaoka, A., Akira, S., *et al.* (2003). Selective contribution of IFN- α /beta signaling to the maturation of dendritic cells induced by double-stranded RNA or viral infection. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *100*, 10872-10877.
- Honda, K., Yanai, H., Mizutani, T., Negishi, H., Shimada, N., Suzuki, N., Ohba, Y., Takaoka, A., Yeh, W.C., and Taniguchi, T. (2004). Role of a transductional-transcriptional processor complex involving MyD88 and IRF-7 in Toll-like receptor signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *101*, 15416-15421.
- Honda, K., Yanai, H., Negishi, H., Asagiri, M., Sato, M., Mizutani, T., Shimada, N., Ohba, Y., Takaoka, A., Yoshida, N., and Taniguchi, T. (2005b). IRF-7 is the master regulator of type-I interferon-dependent immune responses. *Nature* *434*, 772-777.
- Hurst, L.D., and Lercher, M.J. (2005). Unusual linkage patterns of ligands and their cognate receptors indicate a novel reason for non-random gene order in the human genome. *BMC evolutionary biology* *5*, 62.
- Ikushima, H., Munakata, Y., Ishii, T., Iwata, S., Terashima, M., Tanaka, H., Schlossman, S.F., and Morimoto, C. (2000). Internalization of CD26 by mannose 6-phosphate/insulin-like growth factor II receptor contributes to T cell activation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *97*, 8439-8444.
- Imaoka, T., Lynham, J.A., and Haslam, R.J. (1983). Purification and characterization of the 47,000-dalton protein phosphorylated during degranulation of human platelets. *The Journal of biological chemistry* *258*, 11404-11414.
- Iparraguirre, A., Tobias, J.W., Hensley, S.E., Masek, K.S., Cavanagh, L.L., Rendl, M., Hunter, C.A., Ertl, H.C., von Andrian, U.H., and Weninger, W. (2008). Two distinct activation states of plasmacytoid dendritic cells induced by influenza virus and CpG 1826 oligonucleotide. *J Leukoc Biol* *83*, 610-620.
- Iwasaki, A., and Medzhitov, R. (2004). Toll-like receptor control of the adaptive immune responses. *Nature immunology* *5*, 987-995.
- Jaehn, P.S., Zaenker, K.S., Schmitz, J., and Dzionek, A. (2008). Functional dichotomy of plasmacytoid dendritic cells: antigen-specific activation of T cells versus production of type I interferon. *European journal of immunology* *38*, 1822-1832.
- Jähn, P.S., Zanker, K.S., Schmitz, J., and Dzionek, A. (2010). BDCA-2 signaling inhibits TLR-9-agonist-induced plasmacytoid dendritic cell activation and antigen presentation. *Cell Immunol* *265*, 15-22.
- Jakob, T., Walker, P.S., Krieg, A.M., Udey, M.C., and Vogel, J.C. (1998). Activation of cutaneous dendritic cells by CpG-containing oligodeoxynucleotides: a role for dendritic cells in the augmentation of Th1 responses by immunostimulatory DNA. *J Immunol* *161*, 3042-3049.
- Janeway, C.A., Jr. (1989). Approaching the asymptote? Evolution and revolution in immunology. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* *54 Pt 1*, 1-13.
- Janeway, C.A., Jr., and Medzhitov, R. (2002a). Innate immune recognition. *Annual review of immunology* *20*, 197-216.
- Jego, G., Palucka, A.K., Blanck, J.P., Chalouni, C., Pascual, V., and Banchereau, J. (2003). Plasmacytoid dendritic cells induce plasma cell differentiation through type I interferon and interleukin 6. *Immunity* *19*, 225-234.
- Jenkins, N., and Curling, E.M. (1994). Glycosylation of recombinant proteins: problems and prospects. *Enzyme Microb Technol* *16*, 354-364.
- Kadowaki, N., Antonenko, S., Lau, J.Y., and Liu, Y.J. (2000). Natural interferon α /beta-producing cells link innate and adaptive immunity. *The Journal of experimental medicine* *192*, 219-226.

- Kamogawa-Schifter, Y., Ohkawa, J., Namiki, S., Arai, N., Arai, K., and Liu, Y. (2005). Ly49Q defines 2 pDC subsets in mice. *Blood* 105, 2787-2792.
- Kanazawa, N. (2007). Dendritic cell immunoreceptors: C-type lectin receptors for pattern-recognition and signaling on antigen-presenting cells. *J Dermatol Sci* 45, 77-86.
- Karlsson, G.B., and Platt, F.M. (1991). Analysis and isolation of human transferrin receptor using the OKT-9 monoclonal antibody covalently crosslinked to magnetic beads. *Anal Biochem* 199, 219-222.
- Kerkmann, M., Rothenfusser, S., Hornung, V., Towarowski, A., Wagner, M., Sarris, A., Giese, T., Endres, S., and Hartmann, G. (2003). Activation with CpG-A and CpG-B oligonucleotides reveals two distinct regulatory pathways of type I IFN synthesis in human plasmacytoid dendritic cells. *J Immunol* 170, 4465-4474.
- Kingeter, L.M., and Lin, X. (2012). C-type lectin receptor-induced NF-kappaB activation in innate immune and inflammatory responses. *Cell Mol Immunol* 9, 105-112.
- Kline, J.N. (2007). Eat dirt: CpG DNA and immunomodulation of asthma. *Proc Am Thorac Soc* 4, 283-288.
- Klinman, D.M. (2006). Adjuvant activity of CpG oligodeoxynucleotides. *Int Rev Immunol* 25, 135-154.
- Kogelberg, H., and Feizi, T. (2001). New structural insights into lectin-type proteins of the immune system. *Current opinion in structural biology* 11, 635-643.
- Kolbe, B. (2004). Identifizierung und Charakterisierung von BDCA-2L. Diplomarbeit.
- Kolbe, B. (2010). Identifizierung und funktionelle Charakterisierung des CD303L - Der natürliche Ligand zu CD303-einem für plasmazytoide dendritische Zellen spezifischen C-Typ Lektin. In *Forschung und Entwicklung*, Miltenyi Biotec GmbH (Bergisch Gladbach).
- Kotera, Y., Fontenot, J.D., Pecher, G., Metzgar, R.S., and Finn, O.J. (1994). Humoral immunity against a tandem repeat epitope of human mucin MUC-1 in sera from breast, pancreatic, and colon cancer patients. *Cancer Res* 54, 2856-2860.
- Krieg, A.M. (2002). CpG motifs in bacterial DNA and their immune effects. *Annual review of immunology* 20, 709-760.
- Krug, A., French, A.R., Barchet, W., Fischer, J.A., Dzionek, A., Pingel, J.T., Orihuela, M.M., Akira, S., Yokoyama, W.M., and Colonna, M. (2004a). TLR9-dependent recognition of MCMV by IPC and DC generates coordinated cytokine responses that activate antiviral NK cell function. *Immunity* 21, 107-119.
- Krug, A., Luker, G.D., Barchet, W., Leib, D.A., Akira, S., and Colonna, M. (2004b). Herpes simplex virus type 1 activates murine natural interferon-producing cells through toll-like receptor 9. *Blood* 103, 1433-1437.
- Krug, A., Rothenfusser, S., Hornung, V., Jahrsdorfer, B., Blackwell, S., Ballas, Z.K., Endres, S., Krieg, A.M., and Hartmann, G. (2001a). Identification of CpG oligonucleotide sequences with high induction of IFN-alpha/beta in plasmacytoid dendritic cells. *European journal of immunology* 31, 2154-2163.
- Krug, A., Towarowski, A., Britsch, S., Rothenfusser, S., Hornung, V., Bals, R., Giese, T., Engelmann, H., Endres, S., Krieg, A.M., and Hartmann, G. (2001b). Toll-like receptor expression reveals CpG DNA as a unique microbial stimulus for plasmacytoid dendritic cells which synergizes with CD40 ligand to induce high amounts of IL-12. *European journal of immunology* 31, 3026-3037.
- Kumar, S., Sheokand, N., Mhadeshwar, M.A., Raje, C.I., and Raje, M. (2012). Characterization of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase as a novel transferrin receptor. *The international journal of biochemistry & cell biology* 44, 189-199.
- Kuwana, M. (2002). Induction of anergic and regulatory T cells by plasmacytoid dendritic cells and other dendritic cell subsets. *Hum Immunol* 63, 1156-1163.
- Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.

- Le Bon, A., Etchart, N., Rossmann, C., Ashton, M., Hou, S., Gewert, D., Borrow, P., and Tough, D.F. (2003). Cross-priming of CD8⁺ T cells stimulated by virus-induced type I interferon. *Nature immunology* 4, 1009-1015.
- Le Bon, A., Schiavoni, G., D'Agostino, G., Gresser, I., Belardelli, F., and Tough, D.F. (2001). Type I interferons potently enhance humoral immunity and can promote isotype switching by stimulating dendritic cells in vivo. *Immunity* 14, 461-470.
- Lee, A.G. (2004). How lipids affect the activities of integral membrane proteins. *Biochim Biophys Acta* 1666, 62-87.
- LeibundGut-Landmann, S., Gross, O., Robinson, M.J., Osorio, F., Slack, E.C., Tsoni, S.V., Schweighoffer, E., Tybulewicz, V., Brown, G.D., Ruland, J., and Reis e Sousa, C. (2007). Syk- and CARD9-dependent coupling of innate immunity to the induction of T helper cells that produce interleukin 17. *Nature immunology* 8, 630-638.
- Liu, Y.J. (2001). Dendritic cell subsets and lineages, and their functions in innate and adaptive immunity. *Cell* 106, 259-262.
- Liu, Y.J. (2005). IPC: professional type 1 interferon-producing cells and plasmacytoid dendritic cell precursors. *Annual review of immunology* 23, 275-306.
- Ljunggren, H.G., and Karre, K. (1990). In search of the 'missing self': MHC molecules and NK cell recognition. *Immunol Today* 11, 237-244.
- Lo, D., Feng, L., Li, L., Carson, M.J., Crowley, M., Pauza, M., Nguyen, A., and Reilly, C.R. (1999). Integrating innate and adaptive immunity in the whole animal. *Immunol Rev* 169, 225-239.
- Lo, K.M., Sudo, Y., Chen, J., Li, Y., Lan, Y., Kong, S.M., Chen, L., An, Q., and Gillies, S.D. (1998). High level expression and secretion of Fc-X fusion proteins in mammalian cells. *Protein Eng* 11, 495-500.
- Lund, J., Sato, A., Akira, S., Medzhitov, R., and Iwasaki, A. (2003). Toll-like receptor 9-mediated recognition of Herpes simplex virus-2 by plasmacytoid dendritic cells. *The Journal of experimental medicine* 198, 513-520.
- Maecker, H.T., and Trotter, J. (2006). Flow cytometry controls, instrument setup, and the determination of positivity. *Cytometry A* 69, 1037-1042.
- Mahnke, K., Guo, M., Lee, S., Sepulveda, H., Swain, S.L., Nussenzweig, M., and Steinman, R.M. (2000). The dendritic cell receptor for endocytosis, DEC-205, can recycle and enhance antigen presentation via major histocompatibility complex class II-positive lysosomal compartments. *The Journal of cell biology* 151, 673-684.
- Malek, T.R., Ortega, G., Chan, C., Kroczeck, R.A., and Shevach, E.M. (1986). Role of Ly-6 in lymphocyte activation. II. Induction of T cell activation by monoclonal anti-Ly-6 antibodies. *The Journal of experimental medicine* 164, 709-722.
- Marie, I., Smith, E., Prakash, A., and Levy, D.E. (2000). Phosphorylation-induced dimerization of interferon regulatory factor 7 unmasks DNA binding and a bipartite transactivation domain. *Mol Cell Biol* 20, 8803-8814.
- Martinelli, E., Cicala, C., Van Ryk, D., Goode, D.J., Macleod, K., Arthos, J., and Fauci, A.S. (2007). HIV-1 gp120 inhibits TLR9-mediated activation and IFN- α secretion in plasmacytoid dendritic cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104, 3396-3401.
- Matzinger, P. (2002). The danger model: a renewed sense of self. *Science (New York, N.Y.)* 296, 301-305.
- Medzhitov, R. (2001). Toll-like receptors and innate immunity. *Nature reviews* 1, 135-145.
- Medzhitov, R. (2007). Recognition of microorganisms and activation of the immune response. *Nature* 449, 819-826.
- Medzhitov, R., and Janeway, C., Jr. (2000a). Innate immune recognition: mechanisms and pathways. *Immunol Rev* 173, 89-97.
- Medzhitov, R., and Janeway, C.A., Jr. (1998). Innate immune recognition and control of adaptive immune responses. *Semin Immunol* 10, 351-353.

- Medzhitov, R., and Janeway, C.A., Jr. (2000b). How does the immune system distinguish self from nonself? *Semin Immunol* 12, 185-188; discussion 257-344.
- Meyer-Wentrup, F., Benitez-Ribas, D., Tacke, P.J., Punt, C.J., Figdor, C.G., de Vries, I.J., and Adema, G.J. (2008). Targeting DCIR on human plasmacytoid dendritic cells results in antigen presentation and inhibits IFN- α production. *Blood* 111, 4245-4253.
- Meyer-Wentrup, F., Cambi, A., Joosten, B., Looman, M.W., de Vries, I.J., Figdor, C.G., and Adema, G.J. (2009). DCIR is endocytosed into human dendritic cells and inhibits TLR8-mediated cytokine production. *J Leukoc Biol* 85, 518-525.
- Miltenyi, S., Muller, W., Weichel, W., and Radbruch, A. (1990). High gradient magnetic cell separation with MACS. *Cytometry* 11, 231-238.
- Miyazaki, T., Ono, M., Qu, W.M., Zhang, M.C., Mori, S., Nakatsuru, S., Nakamura, Y., Sawasaki, T., Endo, Y., and Nose, M. (2005). Implication of allelic polymorphism of osteopontin in the development of lupus nephritis in MRL/lpr mice. *European journal of immunology* 35, 1510-1520.
- Monti, M., Cozzolino, M., Cozzolino, F., Vitiello, G., Tedesco, R., Flagiello, A., and Pucci, P. (2009). Puzzle of protein complexes in vivo: a present and future challenge for functional proteomics. *Expert Rev Proteomics* 6, 159-169.
- Morgan, D.O., Edman, J.C., Standring, D.N., Fried, V.A., Smith, M.C., Roth, R.A., and Rutter, W.J. (1987). Insulin-like growth factor II receptor as a multifunctional binding protein. *Nature* 329, 301-307.
- Mortier, E., Quemener, A., Vusio, P., Lorenzen, I., Boublik, Y., Grotzinger, J., Plet, A., and Jacques, Y. (2006). Soluble interleukin-15 receptor α (IL-15R α)-sushi as a selective and potent agonist of IL-15 action through IL-15R β / γ . Hyperagonist IL-15 x IL-15R α fusion proteins. *The Journal of biological chemistry* 281, 1612-1619.
- Mossman, S.P., Bex, F., Berglund, P., Arthos, J., O'Neil, S.P., Riley, D., Maul, D.H., Bruck, C., Momin, P., Burny, A., *et al.* (1996). Protection against lethal simian immunodeficiency virus SIVsmmPBj14 disease by a recombinant Semliki Forest virus gp160 vaccine and by a gp120 subunit vaccine. *J Virol* 70, 1953-1960.
- Murad, Y.M., and Clay, T.M. (2009). CpG oligodeoxynucleotides as TLR9 agonists: therapeutic applications in cancer. *BioDrugs* 23, 361-375.
- Muzio, M., Ni, J., Feng, P., and Dixit, V.M. (1997). IRAK (Pelle) family member IRAK-2 and MyD88 as proximal mediators of IL-1 signaling. *Science (New York, N.Y.)* 278, 1612-1615.
- Naarding, M.A., Dirac, A.M., Ludwig, I.S., Speijer, D., Lindquist, S., Vestman, E.L., Stax, M.J., Geijtenbeek, T.B., Pollakis, G., Hernell, O., and Paxton, W.A. (2006). Bile salt-stimulated lipase from human milk binds DC-SIGN and inhibits human immunodeficiency virus type 1 transfer to CD4⁺ T cells. *Antimicrob Agents Chemother* 50, 3367-3374.
- Naik, S.H., Sathe, P., Park, H.Y., Metcalf, D., Proietto, A.I., Dakic, A., Carotta, S., O'Keeffe, M., Bahlo, M., Papenfuss, A., *et al.* (2007). Development of plasmacytoid and conventional dendritic cell subtypes from single precursor cells derived in vitro and in vivo. *Nature immunology* 8, 1217-1226.
- Nakano, H., Yanagita, M., and Gunn, M.D. (2001). CD11c(+)B220(+)Gr-1(+) cells in mouse lymph nodes and spleen display characteristics of plasmacytoid dendritic cells. *The Journal of experimental medicine* 194, 1171-1178.
- Nestle, F.O., Conrad, C., Tun-Kyi, A., Homey, B., Gombert, M., Boyman, O., Burg, G., Liu, Y.J., and Gilliet, M. (2005). Plasmacytoid predendritic cells initiate psoriasis through interferon- α production. *The Journal of experimental medicine* 202, 135-143.

- Netea, M.G., Brown, G.D., Kullberg, B.J., and Gow, N.A. (2008). An integrated model of the recognition of *Candida albicans* by the innate immune system. *Nat Rev Microbiol* 6, 67-78.
- Nilsson, J., Stahl, S., Lundeberg, J., Uhlen, M., and Nygren, P.A. (1997). Affinity fusion strategies for detection, purification, and immobilization of recombinant proteins. *Protein Expr Purif* 11, 1-16.
- Nishizuka, Y. (1984). The role of protein kinase C in cell surface signal transduction and tumour promotion. *Nature* 308, 693-698.
- Niu, L., Heaney, M.L., Vera, J.C., and Golde, D.W. (2000). High-affinity binding to the GM-CSF receptor requires intact N-glycosylation sites in the extracellular domain of the beta subunit. *Blood* 95, 3357-3362.
- Nonaka, M., Ma, B.Y., Murai, R., Nakamura, N., Baba, M., Kawasaki, N., Hodohara, K., Asano, S., and Kawasaki, T. (2008). Glycosylation-dependent interactions of C-type lectin DC-SIGN with colorectal tumor-associated Lewis glycans impair the function and differentiation of monocyte-derived dendritic cells. *J Immunol* 180, 3347-3356.
- Norgard-Sumnicht, K.E., Varki, N.M., and Varki, A. (1993). Calcium-dependent heparin-like ligands for L-selectin in nonlymphoid endothelial cells. *Science (New York, N.Y)* 261, 480-483.
- O'Connell, D., Koenig, A., Jennings, S., Hicke, B., Han, H.L., Fitzwater, T., Chang, Y.F., Varki, N., Parma, D., and Varki, A. (1996). Calcium-dependent oligonucleotide antagonists specific for L-selectin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93, 5883-5887.
- O'Keefe, T.L., Williams, G.T., Batista, F.D., and Neuberger, M.S. (1999). Deficiency in CD22, a B cell-specific inhibitory receptor, is sufficient to predispose to development of high affinity autoantibodies. *The Journal of experimental medicine* 189, 1307-1313.
- Omatsu, Y., Iyoda, T., Kimura, Y., Maki, A., Ishimori, M., Toyama-Sorimachi, N., and Inaba, K. (2005). Development of murine plasmacytoid dendritic cells defined by increased expression of an inhibitory NK receptor, Ly49Q. *J Immunol* 174, 6657-6662.
- Ortega, G., Korty, P.E., Shevach, E.M., and Malek, T.R. (1986). Role of Ly-6 in lymphocyte activation. I. Characterization of a monoclonal antibody to a nonpolymorphic Ly-6 specificity. *J Immunol* 137, 3240-3246.
- Pascual, V., Banchereau, J., and Palucka, A.K. (2003). The central role of dendritic cells and interferon-alpha in SLE. *Curr Opin Rheumatol* 15, 548-556.
- Perussia, B., Fanning, V., and Trinchieri, G. (1985). A leukocyte subset bearing HLA-DR antigens is responsible for in vitro alpha interferon production in response to viruses. *Nat Immun Cell Growth Regul* 4, 120-137.
- Pestka, S., Krause, C.D., and Walter, M.R. (2004). Interferons, interferon-like cytokines, and their receptors. *Immunol Rev* 202, 8-32.
- Pinheiro da Silva, F., Aloulou, M., Benhamou, M., and Monteiro, R.C. (2008). Inhibitory ITAMs: a matter of life and death. *Trends Immunol* 29, 366-373.
- Poeck, H., Wagner, M., Battiany, J., Rothenfusser, S., Wellisch, D., Hornung, V., Jahrsdorfer, B., Giese, T., Endres, S., and Hartmann, G. (2004). Plasmacytoid dendritic cells, antigen, and CpG-C license human B cells for plasma cell differentiation and immunoglobulin production in the absence of T-cell help. *Blood* 103, 3058-3064.
- Poulain, D., and Jouault, T. (2004). *Candida albicans* cell wall glycans, host receptors and responses: elements for a decisive crosstalk. *Current opinion in microbiology* 7, 342-349.
- Preble, O.T., Black, R.J., Friedman, R.M., Klippel, J.H., and Vilcek, J. (1982). Systemic lupus erythematosus: presence in human serum of an unusual acid-labile leukocyte interferon. *Science (New York, N.Y)* 216, 429-431.

- Puertollano, R., Aguilar, R.C., Gorshkova, I., Crouch, R.J., and Bonifacino, J.S. (2001). Sorting of mannose 6-phosphate receptors mediated by the GGAs. *Science (New York, N.Y)* 292, 1712-1716.
- Pyz, E., Marshall, A.S., Gordon, S., and Brown, G.D. (2006). C-type lectin-like receptors on myeloid cells. *Ann Med* 38, 242-251.
- Radbruch, A., Mechtold, B., Thiel, A., Miltenyi, S., and Pfluger, E. (1994). High-gradient magnetic cell sorting. *Methods in cell biology* 42 Pt B, 387-403.
- Raje, C.I., Kumar, S., Harle, A., Nanda, J.S., and Raje, M. (2007). The macrophage cell surface glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase is a novel transferrin receptor. *The Journal of biological chemistry* 282, 3252-3261.
- Rajewsky, K. (1996). Clonal selection and learning in the antibody system. *Nature* 381, 751-758.
- Rawat, P., Kumar, S., Sheokand, N., Raje, C.I., and Raje, M. (2012). The multifunctional glycolytic protein glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) is a novel macrophage lactoferrin receptor. *Biochem Cell Biol* 90, 329-338.
- Reis e Sousa, C. (2001). Dendritic cells as sensors of infection. *Immunity* 14, 495-498.
- Riboldi, E., Daniele, R., Cassatella, M.A., Sozzani, S., and Bosisio, D. (2009). Engagement of BDCA-2 blocks TRAIL-mediated cytotoxic activity of plasmacytoid dendritic cells. *Immunobiology* 214, 868-876.
- Riboldi, E., Daniele, R., Parola, C., Inforzato, A., Arnold, P.L., Bosisio, D., Fremont, D.H., Bastone, A., Colonna, M., and Sozzani, S. (2011). Human C-type lectin domain family 4, member C (CLEC4C/BDCA-2/CD303) is a receptor for asialo-galactosyl-oligosaccharides. *The Journal of biological chemistry* 286, 35329-35333.
- Röck, J. (2007). Funktionelle Charakterisierung eines spezifischen C-Typ-Lektins humaner plasmacytoider dendritischer Zellen. In *Forschung und Entwicklung*, Miltenyi Biotec GmbH (Bergisch Gladbach, Universität Duisburg-Essen).
- Röck, J., Schneider, E., Grun, J.R., Grutzkau, A., Kuppers, R., Schmitz, J., and Winkels, G. (2007). CD303 (BDCA-2) signals in plasmacytoid dendritic cells via a BCR-like signalosome involving Syk, Slp65 and PLCgamma2. *European journal of immunology* 37, 3564-3575.
- Ronnblom, L., and Pascual, V. (2008). The innate immune system in SLE: type I interferons and dendritic cells. *Lupus* 17, 394-399.
- Saijo, S., Fujikado, N., Furuta, T., Chung, S.H., Kotaki, H., Seki, K., Sudo, K., Akira, S., Adachi, Y., Ohno, N., *et al.* (2007). Dectin-1 is required for host defense against *Pneumocystis carinii* but not against *Candida albicans*. *Nature immunology* 8, 39-46.
- Saijo, S., Ikeda, S., Yamabe, K., Kakuta, S., Ishigame, H., Akitsu, A., Fujikado, N., Kusaka, T., Kubo, S., Chung, S.H., *et al.* (2010). Dectin-2 recognition of alpha-mannans and induction of Th17 cell differentiation is essential for host defense against *Candida albicans*. *Immunity* 32, 681-691.
- Samuel, C.E. (2001). Antiviral actions of interferons. *Clin Microbiol Rev* 14, 778-809, table of contents.
- Sancho, D., Joffre, O.P., Keller, A.M., Rogers, N.C., Martinez, D., Hernanz-Falcon, P., Rosewell, I., and Reis e Sousa, C. (2009). Identification of a dendritic cell receptor that couples sensing of necrosis to immunity. *Nature* 458, 899-903.
- Santini, S.M., Lapenta, C., Logozzi, M., Parlato, S., Spada, M., Di Pucchio, T., and Belardelli, F. (2000). Type I interferon as a powerful adjuvant for monocyte-derived dendritic cell development and activity in vitro and in Hu-PBL-SCID mice. *The Journal of experimental medicine* 191, 1777-1788.
- Savas, J.N., Stein, B.D., Wu, C.C., and Yates, J.R. (2011). 3rd Mass spectrometry accelerates membrane protein analysis. *Trends Biochem Sci* 36, 388-396.
- Schlitzer, A., Loschko, J., Mair, K., Vogelmann, R., Henkel, L., Einwachter, H., Schiemann, M., Niess, J.H., Reindl, W., and Krug, A. (2011). Identification of CCR9- murine

- plasmacytoid DC precursors with plasticity to differentiate into conventional DCs. *Blood* 117, 6562-6570.
- Schwab, N., Zozulya, A.L., Kieseier, B.C., Toyka, K.V., and Wiendl, H. (2010). An imbalance of two functionally and phenotypically different subsets of plasmacytoid dendritic cells characterizes the dysfunctional immune regulation in multiple sclerosis. *J Immunol* 184, 5368-5374.
- Seddon, A.M., Curnow, P., and Booth, P.J. (2004). Membrane proteins, lipids and detergents: not just a soap opera. *Biochim Biophys Acta* 1666, 105-117.
- Segura, E., Wong, J., and Villadangos, J.A. (2009). Cutting edge: B220+CCR9- dendritic cells are not plasmacytoid dendritic cells but are precursors of conventional dendritic cells. *J Immunol* 183, 1514-1517.
- Serrano-Gomez, D., Sierra-Filardi, E., Martinez-Nunez, R.T., Caparros, E., Delgado, R., Munoz-Fernandez, M.A., Abad, M.A., Jimenez-Barbero, J., Leal, M., and Corbi, A.L. (2008). Structural requirements for multimerization of the pathogen receptor dendritic cell-specific ICAM3-grabbing non-integrin (CD209) on the cell surface. *The Journal of biological chemistry* 283, 3889-3903.
- Sharon, N., and Lis, H. (1972). Lectins: cell-agglutinating and sugar-specific proteins. *Science* (New York, N.Y.) 177, 949-959.
- Shaw, J., Wang, Y.H., Ito, T., Arima, K., and Liu, Y.J. (2010). Plasmacytoid dendritic cells regulate B-cell growth and differentiation via CD70. *Blood* 115, 3051-3057.
- Shi, B., Ren, G., Hu, Y., Wang, S., Zhang, Z., and Yuan, Z. (2012). HBsAg Inhibits IFN- α Production in Plasmacytoid Dendritic Cells through TNF- α and IL-10 Induction in Monocytes. *PLoS One* 7, e44900.
- Shinohara, M.L., Jansson, M., Hwang, E.S., Werneck, M.B., Glimcher, L.H., and Cantor, H. (2005). T-bet-dependent expression of osteopontin contributes to T cell polarization. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102, 17101-17106.
- Shinohara, M.L., Kim, H.J., Kim, J.H., Garcia, V.A., and Cantor, H. (2008). Alternative translation of osteopontin generates intracellular and secreted isoforms that mediate distinct biological activities in dendritic cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105, 7235-7239.
- Shinohara, M.L., Lu, L., Bu, J., Werneck, M.B., Kobayashi, K.S., Glimcher, L.H., and Cantor, H. (2006). Osteopontin expression is essential for interferon- α production by plasmacytoid dendritic cells. *Nature immunology* 7, 498-506.
- Shortman, K., and Liu, Y.J. (2002). Mouse and human dendritic cell subtypes. *Nature reviews* 2, 151-161.
- Shortman, K., and Naik, S.H. (2007). Steady-state and inflammatory dendritic-cell development. *Nature reviews* 7, 19-30.
- Siegal, F.P., Kadowaki, N., Shodell, M., Fitzgerald-Bocarsly, P.A., Shah, K., Ho, S., Antonenko, S., and Liu, Y.J. (1999). The nature of the principal type 1 interferon-producing cells in human blood. *Science* (New York, N.Y.) 284, 1835-1837.
- Sierra-Filardi, E., Estecha, A., Samaniego, R., Fernandez-Ruiz, E., Colmenares, M., Sanchez-Mateos, P., Steinman, R.M., Granelli-Piperno, A., and Corbi, A.L. (2009). Epitope mapping on the dendritic cell-specific ICAM-3-grabbing non-integrin (DC-SIGN) pathogen-attachment factor. *Molecular immunology*.
- Sisirak, V., Faget, J., Gobert, M., Goutagny, N., Vey, N., Treilleux, I., Renaudineau, S., Poyet, G., Labidi-Galy, S.I., Goddard-Leon, S., *et al.* (2012). Impaired IFN- α production by Plasmacytoid dendritic cells favors regulatory T cell expansion and contributes to breast cancer progression. *Cancer Res.*
- Smyth, M.J., Hayakawa, Y., Takeda, K., and Yagita, H. (2002). New aspects of natural-killer-cell surveillance and therapy of cancer. *Nat Rev Cancer* 2, 850-861.

- Snapper, C.M., Yamaguchi, H., Urban, J.F., Jr., and Finkelman, F.D. (1991). Induction of Ly-6A/E expression by murine lymphocytes after in vivo immunization is strictly dependent upon the action of IFN-alpha/beta and/or IFN-gamma. *International immunology* 3, 845-852.
- Sobanov, Y., Bernreiter, A., Derdak, S., Mechtcheriakova, D., Schweighofer, B., Duchler, M., Kalthoff, F., and Hofer, E. (2001). A novel cluster of lectin-like receptor genes expressed in monocytic, dendritic and endothelial cells maps close to the NK receptor genes in the human NK gene complex. *European journal of immunology* 31, 3493-3503.
- Sodoyer, R. (2004). Expression systems for the production of recombinant pharmaceuticals. *BioDrugs* 18, 51-62.
- Soumelis, V., and Liu, Y.J. (2006). From plasmacytoid to dendritic cell: morphological and functional switches during plasmacytoid pre-dendritic cell differentiation. *European journal of immunology* 36, 2286-2292.
- Spangrude, G.J., and Brooks, D.M. (1993). Mouse strain variability in the expression of the hematopoietic stem cell antigen Ly-6A/E by bone marrow cells. *Blood* 82, 3327-3332.
- Spangrude, G.J., Heimfeld, S., and Weissman, I.L. (1988). Purification and characterization of mouse hematopoietic stem cells. *Science (New York, N.Y.)* 241, 58-62.
- Sparwasser, T., Koch, E.S., Vabulas, R.M., Heeg, K., Lipford, G.B., Ellwart, J.W., and Wagner, H. (1998). Bacterial DNA and immunostimulatory CpG oligonucleotides trigger maturation and activation of murine dendritic cells. *European journal of immunology* 28, 2045-2054.
- Spiro, R.G. (1973). Glycoproteins. *Advances in protein chemistry* 27, 349-467.
- Stambach, N.S., and Taylor, M.E. (2003). Characterization of carbohydrate recognition by langerin, a C-type lectin of Langerhans cells. *Glycobiology* 13, 401-410.
- Steinman, R.M. (1991). The dendritic cell system and its role in immunogenicity. *Annual review of immunology* 9, 271-296.
- Steinman, R.M., and Cohn, Z.A. (1973). Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. I. Morphology, quantitation, tissue distribution. *The Journal of experimental medicine* 137, 1142-1162.
- Stevens, R.C., Yokoyama, S., and Wilson, I.A. (2001). Global efforts in structural genomics. *Science (New York, N.Y.)* 294, 89-92.
- Stonier, S.W., and Schluns, K.S. (2010). Trans-presentation: a novel mechanism regulating IL-15 delivery and responses. *Immunology letters* 127, 85-92.
- Suzuki, K., Zhu, B., Rittling, S.R., Denhardt, D.T., Goldberg, H.A., McCulloch, C.A., and Sodek, J. (2002). Colocalization of intracellular osteopontin with CD44 is associated with migration, cell fusion, and resorption in osteoclasts. *J Bone Miner Res* 17, 1486-1497.
- Svensson, H., Cederblad, B., Lindahl, M., and Alm, G. (1996). Stimulation of natural interferon-alpha/beta-producing cells by *Staphylococcus aureus*. *J Interferon Cytokine Res* 16, 7-16.
- Swiecki, M., Gilfillan, S., Vermi, W., Wang, Y., and Colonna, M. (2010). Plasmacytoid dendritic cell ablation impacts early interferon responses and antiviral NK and CD8(+) T cell accrual. *Immunity* 33, 955-966.
- Takaoka, A., Yanai, H., Kondo, S., Duncan, G., Negishi, H., Mizutani, T., Kano, S., Honda, K., Ohba, Y., Mak, T.W., and Taniguchi, T. (2005). Integral role of IRF-5 in the gene induction programme activated by Toll-like receptors. *Nature* 434, 243-249.
- Taylor, P.R., Martinez-Pomares, L., Stacey, M., Lin, H.H., Brown, G.D., and Gordon, S. (2005). Macrophage receptors and immune recognition. *Annual review of immunology* 23, 901-944.

- Taylor, P.R., Tsoni, S.V., Willment, J.A., Dennehy, K.M., Rosas, M., Findon, H., Haynes, K., Steele, C., Botto, M., Gordon, S., and Brown, G.D. (2007). Dectin-1 is required for beta-glucan recognition and control of fungal infection. *Nature immunology* 8, 31-38.
- Thomas, R., and Lipsky, P.E. (1996). Dendritic cells: origin and differentiation. *Stem cells* (Dayton, Ohio) 14, 196-206.
- Timpano, G., Tabarani, G., Anderluh, M., Invernizzi, D., Vasile, F., Potenza, D., Nieto, P.M., Rojo, J., Fieschi, F., and Bernardi, A. (2008). Synthesis of novel DC-SIGN ligands with an alpha-fucosylamide anchor. *Chembiochem* 9, 1921-1930.
- Tomlinson, S. (1993). Complement defense mechanisms. *Curr Opin Immunol* 5, 83-89.
- Toyama-Sorimachi, N., Omatsu, Y., Onoda, A., Tsujimura, Y., Iyoda, T., Kikuchi-Maki, A., Sorimachi, H., Dohi, T., Taki, S., Inaba, K., and Karasuyama, H. (2005). Inhibitory NK receptor Ly49Q is expressed on subsets of dendritic cells in a cellular maturation- and cytokine stimulation-dependent manner. *J Immunol* 174, 4621-4629.
- Treilleux, I., Blay, J.Y., Bendriss-Vermare, N., Ray-Coquard, I., Bachelot, T., Guastalla, J.P., Bremond, A., Goddard, S., Pin, J.J., Barthelemy-Dubois, C., and Lebecque, S. (2004). Dendritic cell infiltration and prognosis of early stage breast cancer. *Clin Cancer Res* 10, 7466-7474.
- Uhlen, M., Nilsson, B., Guss, B., Lindberg, M., Gatenbeck, S., and Philipson, L. (1983). Gene fusion vectors based on the gene for staphylococcal protein A. *Gene* 23, 369-378.
- van Gisbergen, K.P., Aarnoudse, C.A., Meijer, G.A., Geijtenbeek, T.B., and van Kooyk, Y. (2005a). Dendritic cells recognize tumor-specific glycosylation of carcinoembryonic antigen on colorectal cancer cells through dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule-3-grabbing nonintegrin. *Cancer Res* 65, 5935-5944.
- van Gisbergen, K.P., Ludwig, I.S., Geijtenbeek, T.B., and van Kooyk, Y. (2005b). Interactions of DC-SIGN with Mac-1 and CEACAM1 regulate contact between dendritic cells and neutrophils. *FEBS Lett* 579, 6159-6168.
- van Kooyk, Y. (2008). C-type lectins on dendritic cells: key modulators for the induction of immune responses. *Biochem Soc Trans* 36, 1478-1481.
- van Kooyk, Y., and Geijtenbeek, T.B. (2003). DC-SIGN: escape mechanism for pathogens. *Nature reviews* 3, 697-709.
- Van Liempt, E., Imberty, A., Bank, C.M., Van Vliet, S.J., Van Kooyk, Y., Geijtenbeek, T.B., and Van Die, I. (2004). Molecular basis of the differences in binding properties of the highly related C-type lectins DC-SIGN and L-SIGN to Lewis X trisaccharide and *Schistosoma mansoni* egg antigens. *The Journal of biological chemistry* 279, 33161-33167.
- van Vliet, S.J., van Liempt, E., Saeland, E., Aarnoudse, C.A., Appelmelk, B., Irimura, T., Geijtenbeek, T.B., Blixt, O., Alvarez, R., van Die, I., and van Kooyk, Y. (2005). Carbohydrate profiling reveals a distinctive role for the C-type lectin MGL in the recognition of helminth parasites and tumor antigens by dendritic cells. *International immunology* 17, 661-669.
- Veugelers, K., Motyka, B., Goping, I.S., Shostak, I., Sawchuk, T., and Bleackley, R.C. (2006). Granule-mediated killing by granzyme B and perforin requires a mannose 6-phosphate receptor and is augmented by cell surface heparan sulfate. *Mol Biol Cell* 17, 623-633.
- Vremec, D., and Shortman, K. (1997). Dendritic cell subtypes in mouse lymphoid organs: cross-correlation of surface markers, changes with incubation, and differences among thymus, spleen, and lymph nodes. *J Immunol* 159, 565-573.
- Wang, R.F. (2001). The role of MHC class II-restricted tumor antigens and CD4+ T cells in antitumor immunity. *Trends Immunol* 22, 269-276.
- Weigert, M., Perry, R., Kelley, D., Hunkapiller, T., Schilling, J., and Hood, L. (1980). The joining of V and J gene segments creates antibody diversity. *Nature* 283, 497-499.
- Weis, W.I., Taylor, M.E., and Drickamer, K. (1998). The C-type lectin superfamily in the immune system. *Immunol Rev* 163, 19-34.

- Wollscheid, B., Bausch-Fluck, D., Henderson, C., O'Brien, R., Bibel, M., Schiess, R., Aebersold, R., and Watts, J.D. (2009). Mass-spectrometric identification and relative quantification of N-linked cell surface glycoproteins. *Nature biotechnology* 27, 378-386.
- Wurm, F.M. (2004). Production of recombinant protein therapeutics in cultivated mammalian cells. *Nature biotechnology* 22, 1393-1398.
- Xu, Y., Hu, Y., Shi, B., Zhang, X., Wang, J., Zhang, Z., Shen, F., Zhang, Q., Sun, S., and Yuan, Z. (2009). HBsAg inhibits TLR9-mediated activation and IFN-alpha production in plasmacytoid dendritic cells. *Molecular immunology* 46, 2640-2646.
- Yang, L., Kobie, J.J., and Mosmann, T.R. (2005). CD73 and Ly-6A/E distinguish in vivo primed but uncommitted mouse CD4 T cells from type 1 or type 2 effector cells. *J Immunol* 175, 6458-6464.
- Yao, Y., Richman, L., Morehouse, C., de los Reyes, M., Higgs, B.W., Boutrín, A., White, B., Coyle, A., Krueger, J., Kiener, P.A., and Jallal, B. (2008). Type I interferon: potential therapeutic target for psoriasis? *PLoS One* 3, e2737.
- Yeh, E.T., Reiser, H., Benacerraf, B., and Rock, K.L. (1986). Expression of T-cell-activating protein in peripheral lymphocyte subsets. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 83, 7424-7428.
- Yoneyama, H., Matsuno, K., Zhang, Y., Nishiwaki, T., Kitabatake, M., Ueha, S., Narumi, S., Morikawa, S., Ezaki, T., Lu, B., *et al.* (2004). Evidence for recruitment of plasmacytoid dendritic cell precursors to inflamed lymph nodes through high endothelial venules. *International immunology* 16, 915-928.
- Yokoyama, W.M., and Plougastel, B.F. (2003). Immune functions encoded by the natural killer gene complex. *Nature reviews* 3, 304-316.
- Zelensky, A.N., and Gready, J.E. (2005). The C-type lectin-like domain superfamily. *Febs J* 272, 6179-6217.
- Zhu, B., Suzuki, K., Goldberg, H.A., Rittling, S.R., Denhardt, D.T., McCulloch, C.A., and Sodek, J. (2004). Osteopontin modulates CD44-dependent chemotaxis of peritoneal macrophages through G-protein-coupled receptors: evidence of a role for an intracellular form of osteopontin. *Journal of cellular physiology* 198, 155-167.
- Zohar, R., Suzuki, N., Suzuki, K., Arora, P., Glogauer, M., McCulloch, C.A., and Sodek, J. (2000). Intracellular osteopontin is an integral component of the CD44-ERM complex involved in cell migration. *Journal of cellular physiology* 184, 118-130.
- Zucchini, N., Bessou, G., Robbins, S.H., Chasson, L., Raper, A., Crocker, P.R., and Dalod, M. (2007). Individual plasmacytoid dendritic cells are major contributors to the production of multiple innate cytokines in an organ-specific manner during viral infection. *International immunology* 20, 45-56.

7. Anhang

Tabelle S1. Hochregulierte Gene in Sca-1⁻ PDCs

In vitro generierte PDCs wurden mit Hilfe von Antikörpern gegen Sca-1 und mPDCA-1 nach der magnetischen Anreicherung durchflusszytometrisch in die Sca-1⁺mPDCA-1⁺ und Sca-1⁻mPDCA-1⁺ Subpopulation sortiert (Reinheiten $\geq 97\%$). Danach wurde die Gesamt-RNA isoliert, mit T7-RNA-Polymerase amplifiziert, mit Cy3 markiert und auf Agilent *Whole Mouse Genome Oligo* Microarrays (8x60 K) hybridisiert. Differentiell regulierte Gene wurden mit Hilfe diskriminatorischer Genanalyse (DGA) aus 4 unabhängigen Experimenten ermittelt ($p \leq 0,05$). Aufgelistet sind die Gene, die eine ≥ 2 -fache Expression in Sca-1⁻ PDCs verglichen mit Sca-1⁺ PDCs zeigen.

(SeqName = Sequenz Name, Refseq ID = NCBI Referenz Sequenz)

Reporter ID	SeqName	Refseq ID	Entrez Gene ID	Effektgröße
A_55_P2085142	Spp1	NM_001204233	20750	12,9
A_55_P2182675	Fut7	NM_013524	14347	8,6
A_51_P445473	Fut7	NM_013524	14347	8,1
A_55_P2093433	Kcnk12	NM_199251	210741	6,6
A_51_P108252	Gpsm2	NM_029522	76123	6,6
A_55_P2007964	Cx3cr1	NM_009987	13051	6,5
A_55_P1973770	Unc5b	NM_029770	107449	6,4
A_52_P99810	Cx3cr1	NM_009987	13051	6,1
A_52_P396312	Cdh17	NM_019753	12557	6,1
A_51_P286460	Hist1h2ae	NM_178187	319166	6,0
A_55_P2054362	LOC100048875			6,0
A_55_P2012498	Cdca7	NM_025866	66953	5,9
A_52_P219473	Cdc6	NM_011799	23834	5,7
A_51_P294555	Ifitm6	NM_001033632	213002	5,7
A_52_P214042	Zbtb46	NM_028125	72147	5,6
A_52_P56397	2610002D18Rik	NM_001081099	69885	5,6
A_55_P1964965	Gm1673	NM_001033458	381633	5,6
A_55_P2025033	Cep55	NM_028760	74107	5,5
A_66_P125209	Kif2c	NM_134471	73804	5,5
A_55_P1985544	Kcnk10	NM_029911	72258	5,4
A_55_P2017418	Cfh	NM_009888	12628	5,3
A_55_P2013336	Melk	NM_010790	17279	5,3
A_66_P131979	Cdc6	NM_011799	23834	5,3
A_52_P331762	Lmo1	NM_057173	109594	5,3
A_51_P300337	Csrp2	NM_007792	13008	5,2
A_55_P2119025	2610318N02Rik	NM_183287	70458	5,1
A_51_P195034	Esco2	NM_028039	71988	5,1
A_55_P1988228	Aspm	NM_009791	12316	5,0
A_30_P01025678	A_30_P01025678			5,0
A_51_P254805	Kif4	NM_008446	16571	4,9
A_55_P2148370	TC1695896			4,9
A_52_P190647	Mxd3	NM_016662	17121	4,9
A_51_P357422	2410022L05Rik	NM_025556	66423	4,9

A_55_P2062543	Kifc1	NM_001195298	100042970	4,8
A_52_P537545	Smpd3	NM_021491	58994	4,8
A_51_P273556	Fam83d	NM_027975	71878	4,8
A_55_P2068260	Hist1h3g	NM_145073	97908	4,8
A_51_P414243	C85492	NM_153540	215494	4,7
A_52_P110534	Ttk	NM_009445	22137	4,7
A_66_P120074	Uhrf1	NM_001111079	18140	4,7
A_55_P2139878	NAP102625-1			4,7
A_51_P519791	F630043A04Rik	NM_198605	219114	4,7
A_55_P2123491	B3gnt5	NM_001159407	108105	4,7
A_55_P2076048	Nuf2	NM_023284	66977	4,7
A_55_P2065671	Ccnb1	NM_172301	268697	4,7
A_52_P286098	Epb4.114b	NM_019427	54357	4,6
A_55_P1952256	Ccnb1	NM_172301	268697	4,6
A_66_P133404	2810417H13Rik	NM_026515	68026	4,6
A_52_P227391	Kif15	NM_010620	209737	4,6
A_51_P270949	Hist1h1b	NM_020034	56702	4,6
A_51_P294643	Cdr2	NM_007672	12585	4,6
A_52_P27020	Sgol2	NM_199007	68549	4,6
A_51_P451151	Ube2c	NM_026785	68612	4,6
A_55_P2055189	Kcng1	NM_001081134	241794	4,6
A_66_P106789	Gm6970			4,6
A_55_P2001078	Mme11	NM_013783	27390	4,6
A_52_P104824	Diap3	NM_019670	56419	4,5
A_51_P408071	Kntc1	NM_001042421	208628	4,5
A_66_P134542	Anln	NM_028390	68743	4,5
A_52_P588881	Iqgap3	NM_001033484	404710	4,5
A_55_P2179027	Gem	NM_010276	14579	4,5
A_55_P1983768	Birc5	NM_009689	11799	4,5
A_55_P2005838	5730590G19Rik	NM_029835	77011	4,5
A_52_P612382	Cdc25b	NM_023117	12531	4,5
A_52_P162099	Ckap2	NM_001004140	80986	4,5
A_66_P125327	Ccne1	NM_007633	12447	4,5
A_55_P1980631	Aurkb	NM_011496	20877	4,4
A_52_P420466	Hist1h2ab	NM_175660	319172	4,4
A_55_P2103706	Gm5593			4,4
A_55_P2063146	A_55_P2063146			4,4
A_55_P2118362	Tmem121	NM_153776	69195	4,4
A_55_P2108773	4930427A07Rik	NM_134041	104732	4,4
A_55_P2128668	Ccnb1	NM_172301	268697	4,4
A_55_P2056496	Tkl	NM_009387	21877	4,4
A_55_P2068663	Stmn1	NM_019641	16765	4,4
A_66_P114695	Cdc25c	NM_009860	12532	4,4
A_55_P1998066	Tmem121	NM_153776	69195	4,4
A_55_P1962364	Gm4137			4,4
A_52_P139650	Skal	NM_025581	66468	4,4
A_51_P481398	Kif11	NM_010615	16551	4,3
A_52_P520466	Kif18b	NM_197959	70218	4,3

A_30_P01019819	A_30_P01019819			4,3
A_51_P347240	Ppil5	NM_001081406	69706	4,3
A_55_P2010681	Kif17		16559	4,3
A_52_P400999	Arhgap31	NM_020260	12549	4,3
A_55_P1983769	Birc5	NM_001012273	11799	4,3
A_55_P1996941	Ube2c	NM_026785	68612	4,3
A_55_P2081656	Gm6970			4,3
A_55_P2048588	Cdk1	NM_007659	12534	4,3
A_30_P01021179	A_30_P01021179			4,3
A_51_P204402	Shcbp1	NM_011369	20419	4,3
A_55_P2170681	Cdca8	NM_026560	52276	4,3
A_30_P01023554	A_30_P01023554			4,3
A_55_P2112120	Tnk2	NM_016788	51789	4,3
A_55_P2021447	Fkbp1b	NM_016863	14226	4,3
A_51_P337089	Gins1	NM_027014	69270	4,3
A_52_P399584	Ckap2l	NM_181589	70466	4,3
A_52_P249424	Vegfa	NM_001025257	22339	4,3
A_51_P369200	Tpx2	NM_028109	72119	4,3
A_55_P2101880	Bex6	NM_001033539	328660	4,3
A_51_P239984	Exo1	NM_012012	26909	4,3
A_51_P487999	Sgol1	NM_028232	72415	4,3
A_55_P2035286	Uhrf1	NM_010931	18140	4,3
A_51_P133137	Kif20a	NM_009004	19348	4,3
A_55_P2050439	Dlgap5	NM_144553	218977	4,2
A_51_P303749	Depdc1b	NM_178683	218581	4,2
A_55_P2011937	Figl1	NM_001163359	60530	4,2
A_55_P2126925	5730528L13Rik	NM_001145924	66665	4,2
A_52_P304947	Cenpn	NM_028131	72155	4,2
A_55_P2043862	Stmn1	NM_019641	16765	4,2
A_55_P2011436	Gm11223		100039888	4,2
A_55_P2037439	Depdc1a	NM_001172092	76131	4,2
A_51_P257550	Mareksl1	NM_010807	17357	4,2
A_51_P240453	Nusap1	NM_133851	108907	4,1
A_55_P1980636	Aurka	NM_011497	20878	4,1
A_55_P2101757	Dsccl	NM_183089	72107	4,1
A_52_P318073	NAP102625-1			4,1
A_55_P2076941	Ppil5	NM_001081406	69706	4,1
A_55_P2005060	Ddx43	NM_001191044	100048658	4,1
A_55_P2110713	Anxa2	NM_007585	12306	4,1
A_51_P501018	Nek2	NM_010892	18005	4,1
A_52_P556099	Oip5	NM_001042653	70645	4,1
A_55_P2074381	A_55_P2074381			4,1
A_55_P1959521	Etv4	NM_008815	18612	4,1
A_55_P2069221	Prr11	NM_175563	270906	4,0
A_55_P2028832	Bex6	NM_001033539	328660	4,0
A_30_P01029964	A_30_P01029964			4,0
A_55_P2100209	Kif2c	NM_134471	73804	4,0
A_55_P2003753	Sh2d5	NM_001099631	230863	4,0

A_51_P164014	Cenpe	NM_173762	229841	4,0
A_55_P2244440	4930422G04Rik	NM_197997	71643	4,0
A_51_P457528	Ccnb2	NM_007630	12442	4,0
A_55_P1983773	Birc5	NM_001012273	11799	4,0
A_30_P01028287	A_30_P01028287			4,0
A_51_P123405	Bub1	NM_009772	12235	4,0
A_55_P2110245	Figl1	NM_001163359	60530	4,0
A_51_P455897	Fam64a	NM_144526	109212	4,0
A_55_P2062598	E2f7	NM_178609	52679	4,0
A_66_P119518	Tuba8	NM_017379	53857	4,0
A_51_P481920	Ccna2	NM_009828	12428	3,9
A_30_P01031715	A_30_P01031715			3,9
A_51_P472217	2010317E24Rik	NM_001081085	72080	3,9
A_52_P498208	Hist1h2ak	NM_178183	319169	3,9
A_55_P2063336	4930427A07Rik	NM_134041	104732	3,9
A_55_P2030721	Ankle1	NM_172756	234396	3,9
A_51_P408946	Ccne1	NM_007633	12447	3,9
A_51_P473272	Tspan6	NM_019656	56496	3,9
A_55_P2024391	A_55_P2024391			3,9
A_51_P155142	Cdca8	NM_026560	52276	3,9
A_55_P2000833	E2f8	NM_001013368	108961	3,9
A_55_P2029420	2610318N02Rik	NM_183287	70458	3,9
A_55_P2103831	Gm6653	XR_035409	626115	3,9
A_30_P01020056	A_30_P01020056			3,9
A_52_P513123	Dna2	NM_177372	327762	3,9
A_55_P1996946	Cdc20	NM_023223	107995	3,9
A_51_P195153	Gtse1	NM_013882	29870	3,9
A_51_P291417	Thbd	NM_009378	21824	3,9
A_52_P30989	Cdkn3	NM_028222	72391	3,8
A_30_P01032126	A_30_P01032126			3,8
A_55_P1987499	Pttg1	NM_013917	30939	3,8
A_55_P2029417	2610318N02Rik	NM_183287	70458	3,8
A_51_P463087	Cenpm	NM_178269	66570	3,8
A_55_P2043407	C330027C09Rik	NM_172616	224171	3,8
A_52_P571746	Sh2d5	NM_001099631	230863	3,8
A_55_P2056473	Spc24	NM_026282	67629	3,8
A_51_P470079	Il1r2	NM_010555	16178	3,8
A_55_P2177198	Hist1h2bb	NM_175664	319178	3,8
A_51_P230098	Pbk	NM_023209	52033	3,8
A_55_P2087265	Gm7676		68713	3,8
A_52_P529570	Nsl1	NM_198654	381318	3,8
A_55_P2056654	Kif22	NM_145588	110033	3,8
A_51_P253803	Mki67	NM_001081117	17345	3,8
A_55_P2145136	A_55_P2145136			3,8
A_66_P121459	Cenpa	NM_007681	12615	3,8
A_55_P2110738	Pttg1	NM_013917	30939	3,8
A_55_P1999633	Cit	NM_007708	12704	3,8
A_52_P211223	Cdca2	NM_175384	108912	3,8

A_55_P1995205	Top2a	NM_011623	21973	3,8
A_55_P2058962	Mcm10	NM_027290	70024	3,7
A_66_P109460	Fam54a	NM_027930	71804	3,7
A_55_P1991688	Rad51ap1	NM_009013	19362	3,7
A_51_P246166	Expi	NM_007969	14038	3,7
A_55_P2146254	Ifitm1	NM_001112715	68713	3,7
A_51_P238722	Cd93	NM_010740	17064	3,7
A_55_P2121521	Hist1h3i	NM_178207	319153	3,7
A_55_P2085412	Ankle1	NM_172756	234396	3,7
A_55_P1988083	Prc1	NM_145150	233406	3,7
A_55_P1967291	Ncaph	NM_144818	215387	3,7
A_55_P2173982	Rrm2	NM_009104	20135	3,7
A_52_P354373	1190002F15Rik	NR_037956	381822	3,7
A_51_P344566	Plk1	NM_011121	18817	3,7
A_55_P2171493	BC030867	NM_153544	217216	3,7
A_51_P223709	Pask	NM_080850	269224	3,7
A_51_P490509	Bub1b	NM_009773	12236	3,7
A_51_P191649	Ndc80	NM_023294	67052	3,7
A_51_P330213	Asf1b	NM_024184	66929	3,7
A_51_P148105	Rad51	NM_011234	19361	3,7
A_55_P2187034	A_55_P2187034			3,7
A_51_P416509	Hist1h1a	NM_030609	80838	3,7
A_55_P2056493	ENSMUST00000106328		21877	3,7
A_55_P1987028	Kifc1	NM_053173	16580	3,7
A_55_P1954698	E2f8	XR_105111	100040465	3,7
A_30_P01027809	A_30_P01027809			3,6
A_55_P1997509	Zbtb32	NM_021397	58206	3,6
A_55_P2039324	Ccnf	NM_007634	12449	3,6
A_51_P116906	Rapgef3	NM_144850	223864	3,6
A_30_P01028576	A_30_P01028576			3,6
A_55_P2109717	Kif20b	NM_183046	240641	3,6
A_52_P628067	Cdca3	NM_013538	14793	3,6
A_55_P2040863	Cnn3	NM_028044	71994	3,6
A_66_P127969	Bcat1	NM_007532	12035	3,6
A_52_P75348	Ccdc99	NM_027411	70385	3,6
A_55_P2025790	Fanci	NM_145946	208836	3,6
A_55_P2007273	Pole	NM_011132	18973	3,6
A_55_P2010066	Capn3	NM_007601	12335	3,5
A_30_P01017596	A_30_P01017596			3,5
A_55_P2429225	Psrl	NM_001190161	56742	3,5
A_51_P442964	Casc5	NM_029617	76464	3,5
A_52_P633714	Troap	NM_030159	78733	3,5
A_52_P144285	Fam72a	NM_175382	108900	3,5
A_30_P01018019	A_30_P01018019			3,5
A_51_P123134	Erc61	NM_146235	236930	3,5
A_55_P2106150	Cenpk	NM_021790	60411	3,5
A_51_P360492	Mcm6	NM_008567	17219	3,5
A_51_P190111	Mcm5	NM_008566	17218	3,5

A_55_P2064984	Cenpi	NM_145924	102920	3,5
A_55_P2054342	2810408I11Rik	NR_038009	69941	3,5
A_52_P668285	Plk4	NM_011495	20873	3,5
A_51_P296796	Nt5dc2	NM_027289	70021	3,5
A_55_P1960436	Il12a	NM_001159424	16159	3,5
A_55_P2112125	Tnk2	NM_016788	51789	3,5
A_51_P492830	Cenph	NM_021886	26886	3,5
A_51_P513530	Spag5	NM_017407	54141	3,5
A_66_P130541	Traip	NM_011634	22036	3,5
A_55_P1994418	2310042E22Rik	NM_025634	66561	3,5
A_55_P1994927	Rab3il1	NM_144538	74760	3,4
A_55_P2073377	Mki67	NM_001081117	17345	3,4
A_55_P1967231	Stbd1	NM_175096	52331	3,4
A_52_P231232	Nanos1	NM_178421	332397	3,4
A_51_P125135	Cdca5	NM_026410	67849	3,4
A_51_P442023	Kif17	NM_010623	16559	3,4
A_52_P148212	C79407	NM_172578	217653	3,4
A_55_P2040743	Zwilch	NM_026507	68014	3,4
A_30_P01030626	A_30_P01030626			3,4
A_55_P2086659	Rad54l	NM_009015	19366	3,4
A_66_P133240	Hnrpll	NM_144802	72692	3,4
A_51_P302139	Mastl	NM_025979	67121	3,4
A_52_P332487	Ptpn7	NM_177081	320139	3,4
A_52_P502771	Rad54b	NM_001039556	623474	3,4
A_55_P2111790	Gem	NM_010276	14579	3,4
A_55_P2152427	Zwilch	NM_026507	68014	3,4
A_55_P1965154	Spc25	NM_001199123	66442	3,4
A_52_P706060	Mex3a	NM_001029890	72640	3,4
A_52_P616404	Bard1	NM_007525	12021	3,4
A_30_P01033054	A_30_P01033054			3,3
A_30_P01022276	A_30_P01022276			3,3
A_51_P105709	Trip13	NM_027182	69716	3,3
A_55_P2072035	Thy1	NM_009382	21838	3,3
A_30_P01027299	A_30_P01027299			3,3
A_51_P180140	Hist1h2ba	NM_175663	319177	3,3
A_52_P596755	BC048355	NM_207161	381101	3,3
A_52_P251366	Neil3	NM_146208	234258	3,3
A_52_P508221	A630055G03Rik	NM_001162932	223970	3,3
A_55_P1976127	Ect2	NM_007900	13605	3,3
A_55_P2111478	Polq	NM_029977	77782	3,3
A_55_P1957080	A_55_P1957080			3,3
A_52_P459929	Itga1	NM_001033228	109700	3,3
A_55_P2004801	Tacc3	NM_001040435	21335	3,3
A_52_P609024	Cenpw	NM_001109747	66311	3,3
A_52_P88983	Dock5	NM_177780	68813	3,3
A_55_P2097391	Fam46a	NM_001160378	212943	3,3
A_51_P198775	BC055324	NM_201364	381306	3,3
A_55_P2089035	Pole		18973	3,3

A_52_P556462	Fancd2	NM_001033244	211651	3,2
A_55_P2027317	Casc5		76464	3,2
A_65_P20433	4930547N16Rik	NM_029249	75317	3,2
A_55_P2158011	D2ErtD750e	NM_026412	51944	3,2
A_52_P638895	Vegfa	NM_001025250	22339	3,2
A_55_P2177154	Hist1h2bm	NM_178200	319186	3,2
A_51_P394802	Fam111a	NM_026640	107373	3,2
A_55_P2105678	Ccdc18	NM_028481	73254	3,2
A_55_P2016652	Cdk1	NM_007659	12534	3,2
A_55_P2105271	Pdlim7	NM_001114088	67399	3,2
A_55_P2107045	Myl4	NM_010858	17896	3,2
A_55_P2172560	Gm2973		57441	3,2
A_55_P2051254	Pvt1	NR_003368	19296	3,2
A_51_P228171	Cenpp	NM_025495	66336	3,2
A_51_P202074	Ncapd2	NM_146171	68298	3,1
A_55_P2078459	Kpna2	NM_010655	16647	3,1
A_52_P527800	Emilin2	NM_145158	246707	3,1
A_55_P2094966	Hist2h3c1	NM_178216	15077	3,1
A_55_P2275402	9330177L23Rik		77246	3,1
A_55_P2018904	Gm5465	NM_001034882	432879	3,1
A_52_P502577	Slpr3	NM_010101	13610	3,1
A_51_P393958	Fbxo5	NM_025995	67141	3,1
A_66_P100853	ENSMUST00000091745			3,1
A_55_P2099961	Hist1h2ag	NM_178186	319167	3,1
A_55_P1975843	A_55_P1975843			3,1
A_55_P2106690	Tal1	NM_011527	21349	3,1
A_55_P2138333	Mad2l1	NM_019499	56150	3,1
A_51_P120717	Lmnbl1	NM_010721	16906	3,1
A_55_P2131423	A_55_P2131423			3,1
A_55_P1972792	Stil	NM_009185	20460	3,1
A_66_P102090	Pkmyt1	NM_023058	268930	3,1
A_30_P01023740	A_30_P01023740			3,1
A_52_P108346	Myc	NM_010849	17869	3,1
A_51_P320852	Cd9	NM_007657	12527	3,1
A_51_P205106	Mlf1	NM_010801	17349	3,1
A_52_P6297	Zranb3	NM_027678	226409	3,0
A_51_P167360	Ptpn7	NM_177081	320139	3,0
A_51_P208680	Chtf18	NM_145409	214901	3,0
A_55_P1998578	Ifitm2	NM_030694	80876	3,0
A_30_P01021165	A_30_P01021165			3,0
A_55_P2118309	Gm6091			3,0
A_55_P2182705	Kpna2	NM_010655	16647	3,0
A_51_P420415	Srd5a1	NM_175283	78925	3,0
A_55_P2041693	Gm5834			3,0
A_55_P1997581	A_55_P1997581			3,0
A_51_P247694	Gpr97	NM_173036	54672	3,0
A_51_P136294	Ms4a4b	NM_021718	60361	3,0
A_55_P2123471	Kpna2	NM_010655	16647	3,0

A_55_P1967683	Bex4	NM_212457	406217	3,0
A_51_P410451	Tube1	NM_028006	71924	3,0
A_30_P01029104	A_30_P01029104			3,0
A_55_P2186648	Bard1	NM_007525	12021	3,0
A_55_P2036813	Hist3h2ba	NM_030082	78303	3,0
A_52_P381303	Gins2	NM_178856	272551	3,0
A_51_P500718	Dck	NM_007832	13178	3,0
A_55_P2077263	Cenpk	NM_021790	60411	3,0
A_55_P2133255	Mad2l1	NM_019499	56150	2,9
A_55_P2160296	Olfm1	NM_001038612	56177	2,9
A_55_P1988373	Mlf1ip	NM_027973	71876	2,9
A_52_P480360	Dut	NM_023595	110074	2,9
A_51_P293781	Fkbp1b	NM_016863	14226	2,9
A_51_P418116	Tmem119	NM_146162	231633	2,9
A_52_P205710	Myl10	NM_021611	59310	2,9
A_51_P254045	Traip	NM_011634	22036	2,9
A_55_P2169989	ENSMUST00000054218		75216	2,9
A_52_P241508	Zbtb46	NM_028125	72147	2,9
A_30_P01025383	A_30_P01025383			2,9
A_55_P1997141	Mybl2	NM_008652	17865	2,9
A_55_P2084631	Hist1h2an	NM_178184	319170	2,9
A_51_P401263	Eme1	NM_177752	268465	2,9
A_55_P1990341	Ncapg	NM_019438	54392	2,9
A_66_P130612	2810408A11Rik	NM_027419	70419	2,9
A_51_P507801	F13a1	NM_028784	74145	2,9
A_51_P380013	Bcl2	NM_177410	12043	2,9
A_51_P355151	Camk2n2	NM_028420	73047	2,8
A_55_P2078460	NAP111472-1			2,8
A_30_P01025511	A_30_P01025511			2,8
A_52_P658437	Esp1l	NM_001014976	105988	2,8
A_52_P28806	Foxm1	NM_008021	14235	2,8
A_51_P335460	Scin	NM_009132	20259	2,8
A_55_P1953087	Mcm3	NM_008563	17215	2,8
A_55_P2091402	Kpna2	NM_010655	16647	2,8
A_30_P01027661	A_30_P01027661			2,8
A_51_P196973	Chaf1a	NM_013733	27221	2,8
A_52_P700056	Gm11428	NM_001081957	100034251	2,8
A_55_P1982916	Bzrap1	NM_172449	207777	2,8
A_30_P01033328	A_30_P01033328			2,8
A_51_P273705	Zfp354c	NM_013922	30944	2,8
A_52_P673499	Shmt1	NM_009171	20425	2,8
A_51_P245275	H2afx	NM_010436	15270	2,8
A_55_P1968664	NAP111351-1			2,8
A_55_P2172274	Smc2	NM_008017	14211	2,8
A_55_P1988760	Sestd1	NM_175465	228071	2,8
A_66_P132888	Dhfr	NM_010049	13361	2,8
A_55_P2180176	Ms4a6b	NM_027209	69774	2,8
A_55_P2014229	Sema4a	NM_013658	20351	2,8

A_55_P2149107	BC055324	NM_201364	381306	2,8
A_52_P317393	Gpr56	NM_018882	14766	2,7
A_51_P501656	Kdelc2	NM_212445	68304	2,7
A_66_P130103	Ube2t	NM_026024	67196	2,7
A_66_P132295	Tfpi	NM_011576	21788	2,7
A_55_P2108784	Arhgap22	NM_153800	239027	2,7
A_51_P415905	Pola1	NM_008892	18968	2,7
A_51_P390967	Slc43a3	NM_021398	58207	2,7
A_51_P389636	Kcnn4	NM_008433	16534	2,7
A_52_P330214	Fanca	NM_016925	14087	2,7
A_51_P269687	Pole2	NM_011133	18974	2,7
A_52_P23379	Depdc7	NM_144804	211896	2,7
A_55_P1983450	S100a4	NM_011311	20198	2,7
A_51_P368009	E2f2	NM_177733	242705	2,7
A_55_P2061495	Cks1b	NM_016904	54124	2,7
A_52_P644114	Ccdc18	NM_028481	73254	2,7
A_30_P01028956	A_30_P01028956			2,7
A_66_P116360	NAP000479-001			2,7
A_55_P2302725	C80140		97244	2,7
A_51_P324934	Mcm3		17215	2,7
A_55_P2156016	ENSMUST00000109798	NM_058214	79456	2,7
A_55_P2087172	Gm2685			2,7
A_51_P356931	Orc1l	NM_011015	18392	2,6
A_55_P1973818	Mmel1	NM_013783	27390	2,6
A_51_P227004	Cks1b	NM_016904	54124	2,6
A_51_P168632	Prim1	NM_008921	19075	2,6
A_30_P01025735	A_30_P01025735			2,6
A_51_P314397	Crip2	NM_024223	68337	2,6
A_55_P2089530	Fkbp10	NM_010221	14230	2,6
A_30_P01030134	A_30_P01030134			2,6
A_55_P2036883	Hist2h2bb	NM_175666	319189	2,6
A_55_P2115691	TC1615277			2,6
A_66_P102528	Tspan5	NM_019571	56224	2,6
A_30_P01032460	A_30_P01032460			2,6
A_51_P109050	Paqr4	NM_023824	76498	2,6
A_55_P1983448	S100a4	NM_011311	20198	2,6
A_30_P01025989	A_30_P01025989			2,6
A_51_P134812	Chac1	NM_026929	69065	2,6
A_52_P151320	Tnfaip8l1	NM_025566	66443	2,6
A_52_P100185	4930503L19Rik	NM_172967	269033	2,6
A_66_P131110	Zfp473	NM_178734	243963	2,6
A_65_P10450	Tmpo	NM_011605	21917	2,6
A_30_P01027478	A_30_P01027478			2,6
A_55_P2113081	Tmem132a	NM_133804	98170	2,6
A_55_P1969341	Brip1	NM_178309	237911	2,6
A_51_P328489	1700025G04Rik	NM_197990	69399	2,6
A_66_P114176	Hist2h2ab	NM_178213	621893	2,5
A_55_P2163428	Foxm1	NM_008021	14235	2,5

A_55_P2158701	Hist1h4d	NM_175654	319156	2,5
A_55_P1953387	Fabp5	NM_010634	16592	2,5
A_55_P1992421	Hmgb3	NM_008253	15354	2,5
A_55_P2084656	Hist1h2ah	NM_175659	319168	2,5
A_55_P1994939	Hmgb2	NM_008252	97165	2,5
A_52_P313728	Rad54b	NM_001039556	623474	2,5
A_55_P2164534	Dtl	NM_029766	76843	2,5
A_52_P655265	6720463M24Rik	NM_175265	77744	2,5
A_30_P01021644	A_30_P01021644			2,5
A_52_P537566	Cenpt	NM_177150	320394	2,5
A_51_P367310	Chaf1b	NM_028083	110749	2,5
A_55_P2131899	Sox4	NM_009238	20677	2,5
A_51_P351970	Hells	NM_008234	15201	2,5
A_55_P2161865	Pdlim7	NM_026131	67399	2,5
A_55_P2150976	Fabp5l2			2,5
A_51_P285446	Lig1	NM_010715	16881	2,5
A_55_P2091147	Hist1h4k	NM_178211	319160	2,5
A_55_P2129925	Mybl2	NM_008652	17865	2,5
A_51_P351363	Tyms-ps	NR_000040	22172	2,5
A_55_P2071846	A_55_P2071846			2,5
A_51_P133612	Cdt1	NM_026014	67177	2,5
A_55_P2128646	Gmnn	NM_020567	57441	2,5
A_51_P165704	Mcm7	NM_008568	17220	2,5
A_55_P1967933	LOC100045534			2,5
A_55_P2149951	Prx	NM_019412	19153	2,5
A_65_P05396	Rad18	NM_021385	58186	2,5
A_52_P625912	Klrb1f	NM_153094	232408	2,5
A_52_P250034	LOC677447		77011	2,5
A_30_P01023701	A_30_P01023701			2,4
A_55_P2085181	Chaf1b	NM_028083	110749	2,4
A_51_P209280	Rab31	NM_133685	106572	2,4
A_30_P01020178	A_30_P01020178			2,4
A_51_P237512	Fam33a	NM_025377	66140	2,4
A_55_P2057803	6330403A02Rik	NM_001081227	381310	2,4
A_30_P01021493	A_30_P01021493			2,4
A_55_P1988613	Mdm1	NM_001162904	17245	2,4
A_55_P1998072	LOC100048743			2,4
A_51_P320022	Atp10a	NM_009728	11982	2,4
A_51_P148612	Cox7a1	NM_009944	12865	2,4
A_52_P512519	Cdc7	NM_009863	12545	2,4
A_30_P01029071	A_30_P01029071			2,4
A_55_P2122841	NAP114472-1			2,4
A_55_P2125013	Hist1h4j	NM_178210	319159	2,4
A_30_P01022893	A_30_P01022893			2,4
A_65_P17827	Cenpl	NM_027429	70454	2,4
A_55_P2086423	Recql4	NM_058214	79456	2,4
A_66_P139159	Hrasl		15461	2,4
A_55_P1972605	Adora3	NM_009631	11542	2,4

A_52_P164709	Poc1a	NM_027354	70235	2,4
A_55_P1965174	Fbxl2	NM_178624	72179	2,4
A_55_P1956752	Ska2l-ps			2,4
A_52_P227880	Cenpf	NM_001081363	108000	2,4
A_51_P425962	Khdrbs3	NM_010158	13992	2,4
A_51_P332355	Kif18a	NM_139303	228421	2,4
A_55_P2365897	AU018505		99183	2,4
A_55_P1975021	Rad18	NM_001167730	58186	2,4
A_52_P659312	Spsb4	NM_145134	211949	2,4
A_30_P01026296	A_30_P01026296			2,4
A_30_P01030126	A_30_P01030126			2,4
A_51_P401683	Tm6sfl	NM_145375	107769	2,4
A_55_P2084652	Hist1h2ak	NM_178183	319169	2,4
A_55_P2081616	Timeless	NM_001164081	21853	2,4
A_55_P2341368	E030011O05Rik		245007	2,4
A_55_P1973349	Hist2h4	NM_033596	97122	2,4
A_55_P1985143	A_55_P1985143			2,4
A_30_P01029173	A_30_P01029173			2,3
A_55_P2121608	Sox4		20677	2,3
A_55_P2057142	Gm6531	NM_001037922	624855	2,3
A_55_P1988246	NAP113539-1			2,3
A_55_P2179296	Mad2l1	NM_019499	56150	2,3
A_30_P01025707	A_30_P01025707			2,3
A_55_P2042456	Vgll2	NM_153786	215031	2,3
A_51_P356762	Mcm4	NM_008565	17217	2,3
A_55_P2121613	Sox4	NM_009238	20677	2,3
A_55_P2027136	Hist1h3f	NM_013548	260423	2,3
A_51_P421140	Tubb6	NM_026473	67951	2,3
A_30_P01017743	A_30_P01017743			2,3
A_55_P2130090	Cnn3	NM_028044	71994	2,3
A_55_P2067251	Tmpo	NM_001080129	21917	2,3
A_55_P2094118	Fmnl3	NM_011711	22379	2,3
A_65_P06603	Ahr	NM_013464	11622	2,3
A_52_P240447	Alms1	NM_145223	236266	2,3
A_55_P2084666	Hist1h2af	NM_175661	319173	2,3
A_30_P01022834	A_30_P01022834			2,3
A_30_P01018593	A_30_P01018593			2,3
A_51_P396163	Mdm1		17245	2,3
A_55_P2099605	Ect2		13605	2,3
A_55_P2186395	Gm6340	XM_887100	622657	2,3
A_55_P1988754	Hist4h4	NM_175652	320332	2,3
A_55_P2114201	G2e3	NM_001167963	217558	2,3
A_51_P353543	Magee2	NM_053206	272790	2,3
A_52_P15212	Ctbp2	NM_009980	13017	2,3
A_55_P2062627	2210411K11Rik	NM_029384	664968	2,3
A_51_P496309	Rfx4	NM_001024918	71137	2,3
A_55_P1990785	Zranb3	NM_027678	226409	2,3
A_51_P427917	Il31ra	NM_139299	218624	2,3

A_55_P2016732	Slc30a2	NM_001039677	230810	2,3
A_55_P2077228	Cenpl	NM_001159930	70454	2,3
A_30_P01025009	A_30_P01025009			2,3
A_51_P241791	Mlflip	NM_027973	71876	2,3
A_55_P2059686	Rcc1	NM_001197082	100088	2,3
A_55_P2145637	Ap1s3		252903	2,3
A_55_P2206461	A930006K02Rik		78433	2,3
A_51_P464822	Hist1hle	NM_015787	50709	2,3
A_51_P151586	Gsg2	NM_010353	14841	2,3
A_66_P129188	Hist2h2ac	NM_175662	319176	2,3
A_52_P476075	Clspn	NM_175554	269582	2,3
A_55_P2154132	Tuba1b	NM_011654	22143	2,3
A_30_P01025586	A_30_P01025586			2,3
A_55_P2024773	Rbl1	NM_001139516	19650	2,3
A_30_P01031282	A_30_P01031282			2,3
A_55_P2001148	Pdlim5	NM_019809	56376	2,2
A_55_P2023188	Lsm2	NM_030597	27756	2,2
A_55_P2011146	Reep1	NM_178608	52250	2,2
A_51_P380005	Galnt3	NM_015736	14425	2,2
A_30_P01026716	A_30_P01026716			2,2
A_55_P2181963	Gm8369	NM_001164202	666926	2,2
A_52_P163795	Tubb5	NM_011655	22154	2,2
A_55_P1965050	Cks2	NM_025415	66197	2,2
A_55_P2164139	NAP112120-1			2,2
A_51_P227718	Rasgrp4	NM_145149	233046	2,2
A_55_P2382345	4933435E02Rik		71291	2,2
A_51_P314418	Blm	NM_007550	12144	2,2
A_52_P476560	Tpcn1	NM_145853	252972	2,2
A_51_P425847	Ulbp1		77777	2,2
A_55_P2187918	Cep55	NM_028760	74107	2,2
A_51_P100174	Mns1	NM_008613	17427	2,2
A_55_P2041708	Gas2	NM_008087	14453	2,2
A_51_P270519	Apitd1	NM_027263	69928	2,2
A_55_P2348799	1700025G04Rik	NM_197990	69399	2,2
A_55_P2137706	Tmpo	NM_001080129	21917	2,2
A_66_P104422	Ckap4	NM_175451	216197	2,2
A_51_P137111	Chek2	NM_016681	50883	2,2
A_66_P137605	E330016A19Rik	NM_173386	214763	2,2
A_51_P438859	Pmfl	NM_025928	67037	2,2
A_55_P2090280	Gm4340	NM_001177535	100043292	2,2
A_55_P2048779	Fam84b	NM_001162926	399603	2,2
A_30_P01021183	A_30_P01021183			2,2
A_30_P01028673	A_30_P01028673			2,2
A_55_P1973560	A_55_P1973560			2,2
A_30_P01022823	A_30_P01022823			2,2
A_66_P120603	Trps1	NM_032000	83925	2,2
A_52_P363216	Gcnt2	NM_133219	14538	2,2
A_51_P463440	Elovl6	NM_130450	170439	2,2

A_55_P2126368	Atad5	NM_001029856	237877	2,1
A_52_P238044	Psmc3ip	NM_008949	19183	2,1
A_55_P2087944	Gm15452			2,1
A_55_P2091145	Hist1h4k	NM_178211	319160	2,1
A_51_P502082	Rrm1	NM_009103	20133	2,1
A_55_P2079390	4930579G24Rik	NM_029482	75939	2,1
A_51_P204103	Olf1442	NM_146697	258692	2,1
A_51_P336721	Tipin	NM_025372	66131	2,1
A_55_P2040485	Ms4a4a	XM_003086124	666907	2,1
A_55_P1972018	Hist1h4c	NM_178208	319155	2,1
A_52_P134228	Lsm11	NM_028185	72290	2,1
A_55_P2111355	Egfl7	NM_178444	353156	2,1
A_30_P01021843	A_30_P01021843			2,1
A_51_P248387	Pcyox11	NM_172832	240334	2,1
A_55_P2106569	ENSMUST00000079084			2,1
A_51_P153734	Kif23		71819	2,1
A_51_P407606	Tmem48	NM_028355	72787	2,1
A_55_P2320668	1700013G23Rik	XR_106238		2,1
A_55_P1998947	Trim16	NM_053169	94092	2,1
A_55_P2034938	Mbd5		109241	2,1
A_30_P01024970	A_30_P01024970			2,1
A_30_P01017686	A_30_P01017686			2,1
A_51_P315795	Tubb4	NM_009451	22153	2,1
A_55_P1966528	Pmfl	NM_025928	67037	2,1
A_55_P2096933	Cntln	NM_177385	338349	2,1
A_55_P2159801	Rfc4	NM_145480	106344	2,1
A_51_P438083	Slc6a13	NM_144512	14412	2,1
A_66_P134481	Skp2	NM_145468	27401	2,1
A_51_P170807	Map3k6	NM_016693	53608	2,1
A_51_P101460	Dsp	NM_023842	109620	2,1
A_55_P2081615	Timeless	NM_001164081	21853	2,1
A_30_P01019123	A_30_P01019123			2,1
A_51_P137419	Cst7	NM_009977	13011	2,1
A_51_P323521	Snx21	NM_133924	101113	2,1
A_51_P273538	Syce2	NM_027954	71846	2,1
A_55_P2028054	Incenp	NM_016692	16319	2,1
A_52_P585124	Cxcr4	NM_009911	12767	2,1
A_30_P01026611	A_30_P01026611			2,1
A_30_P01024344	A_30_P01024344			2,1
A_51_P167922	Tifab	NM_145976	212937	2,1
A_55_P2131438	Hist2h2aa2	NM_178212	319192	2,1
A_52_P411003	Dlgap5	NM_144553	218977	2,1
A_55_P1954221	Emp1	NM_010128	13730	2,1
A_55_P2053258	Poc1a	NM_027354	70235	2,1
A_55_P2122020	Klf4	NM_010637	16600	2,1
A_55_P2215142	4930515I15		328633	2,1
A_51_P324287	Kif23	NM_024245	71819	2,1
A_51_P300936	Rbbp8	NM_001081223	225182	2,1

A_55_P1972882	E230028L10Rik			2,1
A_52_P407692	H2afj	NM_177688	232440	2,1
A_55_P2084696	Hist1h2aa	NM_175658	319163	2,1
A_55_P2179314	MacroD2	NM_028387	72899	2,1
A_51_P238448	Ccnd3	NM_007632	12445	2,1
A_55_P1993503	Adora2b	NM_007413	11541	2,0
A_55_P2007713	Tspan4	NM_053082	64540	2,0
A_55_P2083419	Pkp4	NM_026361	227937	2,0
A_55_P2025078	Csflr	NM_001037859	12978	2,0
A_30_P01026091	A_30_P01026091			2,0
A_51_P167971	Bace1	NM_011792	23821	2,0
A_55_P2031989	Rin2	NM_028724	74030	2,0
A_51_P113178	6530418L21Rik	NM_175398	109050	2,0
A_30_P01020075	A_30_P01020075			2,0
A_55_P2111336	ENSMUST00000098232		212390	2,0
A_52_P208613	Fancb	NM_175027	237211	2,0
A_51_P165683	Hirip3	NM_172746	233876	2,0
A_51_P272876	Fam46a	XM_135029	212943	2,0
A_30_P01033518	A_30_P01033518			2,0
A_55_P1970454	Usp35			2,0
A_51_P369252	4632434I11Rik	NM_001080995	74041	2,0
A_55_P2023391	Grhl3	NM_001013756	230824	2,0
A_55_P2116496	Tuba1b	NM_011654	22143	2,0
A_51_P472249	Slc7a7	NM_011405	20540	2,0
A_55_P2240823	Epb4.1	NM_001128606	269587	2,0
A_55_P1992839	Dsn1	NM_025853	66934	2,0
A_55_P2159807	Rfc4	NM_145480	106344	2,0
A_51_P158210	Mcm2	NM_008564	17216	2,0
A_55_P2094524	Gm14005	NR_028590	100043424	2,0
A_30_P01017680	A_30_P01017680			2,0
A_66_P121077	Spata24	NM_029485	71242	2,0
A_51_P309589	2700099C18Rik	NR_024720	77022	2,0
A_66_P136186	Wee1	NM_009516	22390	2,0
A_51_P292116	Ical	NM_010492	15893	2,0

Tabelle S2. Hochregulierte Gene in Sca-1⁺ PDCs

Zellen wurden wie in der Tabelle S1 beschrieben analysiert. Aufgelistet sind die Gene, die eine ≥ 2 -fache Expression in Sca-1⁺ PDCs verglichen mit Sca-1⁻ PDCs aufweisen.

(SeqName = Sequenz Name, Refseq ID = NCBI Referenz Sequenz)

Reporter ID	SeqName	Refseq ID	Entrez Gene ID	Effektgröße
A_51_P265495	Ly6a	NM_010738	110454	-25,3
A_55_P2045136	I830127L07Rik	XM_001477102	546643	-22,8
A_51_P517695	Ly6f	NM_008530	17071	-18,1
A_51_P150710	Igj	NM_152839	16069	-5,0
A_66_P122086	9030619P08Rik	NM_001039720	105892	-4,7
A_55_P2095311	ENSMUST00000023246	XM_001475753	546644	-3,9
A_55_P2187211	ENSMUST00000074488			-3,6
A_55_P2111322	ENSMUST00000103741	XR_105809	100505358	-3,6
A_55_P2018357	Ankrd56	NM_175270	78088	-3,5
A_51_P204247	C8a	NM_146148	230558	-3,5
A_52_P523445	Cdhr5	NM_028069	72040	-3,5
A_55_P1996746	Gm3142	XM_001475809	100041107	-3,5
A_55_P2060897	ENSMUST00000103410			-3,4
A_55_P2153872	Itgb3bp	NM_026348	67733	-3,3
A_51_P516085	Dntt	NM_009345	21673	-3,2
A_30_P01026989	A_30_P01026989			-3,1
A_55_P2179890	Vmn1r101	NM_001166836	100042968	-3,1
A_30_P01032504	A_30_P01032504			-3,1
A_52_P322096	Patl2	NM_026251	67578	-2,9
A_51_P367780	Adamtsl2	NM_029981	77794	-2,9
A_51_P229990	Rab30	NM_029494	75985	-2,8
A_51_P237106	Olfir1211	NM_001011804	258025	-2,7
A_55_P1961736	Rcan2	NM_207649	53901	-2,7
A_30_P01032599	A_30_P01032599			-2,7
A_51_P150120	Mgst2	NM_174995	211666	-2,7
A_55_P2039684	Gpr34	NM_011823	23890	-2,7
A_55_P2016792	Inpp4b	NM_001024617	234515	-2,7
A_55_P2311720	E330024J20Rik		320654	-2,7
A_30_P01032839	A_30_P01032839			-2,6
A_52_P708792	Gm5547	XR_104813	433637	-2,6
A_55_P1965416	Atp9a	NM_015731	11981	-2,6
A_66_P106808	Scn3a	NM_018732	20269	-2,6
A_52_P470466	D3Bwg0562e	NM_177664	229791	-2,6
A_52_P521324	A930024E05Rik	XR_106121	109202	-2,6
A_55_P1968508	A_55_P1968508			-2,6
A_66_P103753	ENSMUST00000065594	XR_105429	791413	-2,6
A_55_P2100928	Ptgds	NM_008963	19215	-2,5
A_30_P01022025	A_30_P01022025			-2,5
A_55_P2115166	AI661453	NM_145489	224833	-2,5
A_55_P2065294	ENSMUST00000112407		20269	-2,5
A_55_P2043182	Gimap6	NM_153175	231931	-2,5
A_51_P142896	Cd59a	NM_007652	12509	-2,5

A_55_P2019233	Gsto2	NM_026619	68214	-2,5
A_55_P2057283	ENSMUST00000103749			-2,5
A_55_P2145224	ENSMUST00000103743			-2,5
A_51_P483576	ENSMUST00000103743			-2,5
A_55_P2096081	Myo5b	NM_201600	17919	-2,5
A_55_P2277019	Loxl3	NM_013586	16950	-2,4
A_55_P2065288	Scn3a		20269	-2,4
A_51_P506328	Cyp2j6	NM_010008	13110	-2,4
A_52_P161630	St6gal1	NM_145933	20440	-2,4
A_55_P2141152	Ido1	NM_008324	15930	-2,4
A_55_P2119772	Scn3a	NM_018732	20269	-2,4
A_51_P268234	Il34	NM_029646	76527	-2,4
A_55_P2070262	Gm10621			-2,4
A_55_P1973514	Duxbl	NM_183389	278672	-2,4
A_55_P2063316	Mgll	NM_001166251	23945	-2,4
A_55_P2105878	Ccr10	NM_007721	12777	-2,3
A_55_P2066230	Hck	NM_001172117	15162	-2,3
A_30_P01021671	A_30_P01021671			-2,3
A_55_P2001553	Igdcc4	NM_020043	56741	-2,3
A_52_P426768	Cited4	NM_019563	56222	-2,3
A_55_P2409088	BB163080		106459	-2,3
A_55_P2082929	H2-Ob	NM_010389	15002	-2,3
A_55_P2135331	Evl	NM_001163394	14026	-2,3
A_55_P2141088	ENSMUST00000107165		23966	-2,3
A_55_P2108943	Ccr6	NM_009835	12458	-2,3
A_66_P125035	Gm10394	NM_001177538	100039227	-2,3
A_55_P2020538	A_55_P2020538			-2,3
A_55_P2105542	Pde2a	NM_001143848	207728	-2,3
A_51_P295034	Klk1b4	NM_010915	18048	-2,3
A_55_P2087622	Il4i1	NM_010215	14204	-2,3
A_55_P2013158	Ablim1	NM_178688	226251	-2,3
A_51_P183912	Il27ra	NM_016671	50931	-2,3
A_55_P2156731	H2-Eb1	NM_010382	14969	-2,2
A_51_P246066	Slamf9	NM_029612	98365	-2,2
A_55_P2025006	Klk1b26	NM_010644	16618	-2,2
A_55_P2342030	1700101I11Rik		67930	-2,2
A_30_P01029641	A_30_P01029641			-2,2
A_55_P1969615	Pnck	NM_001199351	93843	-2,2
A_55_P2144095	LOC100045542			-2,2
A_55_P2130970	Parp10	NM_001163576	671535	-2,2
A_30_P01027959	A_30_P01027959			-2,2
A_51_P127297	Hsd11b1	NM_008288	15483	-2,2
A_55_P2023484	Osbp15	NM_024289	79196	-2,2
A_51_P413147	Klk1b3	NM_008693	18050	-2,1
A_52_P487599	Thns12	NM_178413	232078	-2,1
A_55_P2005956	Egfbp2	NM_010115	13647	-2,1
A_55_P2185628	XM_001474681			-2,1
A_51_P115715	Asb2	NM_023049	65256	-2,1

A_55_P2068708	Gm6280	XM_886462	622052	-2,1
A_55_P2073313	Unc79	NM_001081017	217843	-2,1
A_66_P130035	Klk1b24	NM_010643	16617	-2,1
A_51_P351194	Cnfn	NM_028219	72383	-2,1
A_51_P155503	Klk1b8	NM_008457	16624	-2,1
A_55_P1996702	Grm8	NM_008174	14823	-2,1
A_55_P1973501	Ceacam16	NM_001033419	330483	-2,1
A_30_P01025834	A_30_P01025834			-2,1
A_55_P2082989	5430435G22Rik	NM_145509	226421	-2,1
A_66_P136971	Klk1b21	NM_010642	16616	-2,1
A_52_P504268	B3galnt1	NM_020026	26879	-2,1
A_51_P245414	Klk1	NM_010639	16612	-2,1
A_55_P2088495	LOC641235			-2,1
A_55_P1970329	Gm10696	NM_001146107	100043188	-2,1
A_55_P2179074	Ciita	NM_007575	12265	-2,1
A_30_P01029280	A_30_P01029280			-2,1
A_30_P01022023	A_30_P01022023			-2,0
A_55_P2181938	LOC100048271			-2,0
A_55_P2185900	Nrg4	NM_032002	83961	-2,0
A_55_P2084512	ENSMUST00000094445		100041960	-2,0
A_55_P2002068	Gm10510		100038481	-2,0
A_55_P2364985	4930540M05Rik		112414	-2,0
A_55_P1978465	H2-Q8	NM_023124	15019	-2,0
A_55_P2070686	Wdfy1	NM_027057	69368	-2,0
A_55_P2020338	Scml4	NM_172938	268297	-2,0
A_66_P139615	Gm12409		100040567	-2,0
A_51_P284608	Cd74	NM_001042605	16149	-2,0
A_55_P1985005	Ghrh	NM_010285	14601	-2,0
A_30_P01030209	A_30_P01030209			-2,0
A_52_P660861	Napb	NM_019632	17957	-2,0
A_51_P125842	Tmem51	NM_145402	214359	-2,0

Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich ganz herzlich bei Prof. Dr. Ralf Küppers für die ausgezeichnete Betreuung, die hilfreichen Ratschläge, die Korrektur und die Bereitschaft die vorliegende Arbeit zu bewerten, bedanken.

Ich danke Dr. Jürgen Schmitz für die Möglichkeit zur Durchführung dieser Arbeit in der Forschungs- und Entwicklungsabteilung der Miltenyi Biotec GmbH und das große Interesse an den Projekten.

Ganz besonders möchte ich mich bei Dr. Ian Johnston für seine hervorragende Betreuung der Arbeit bedanken. Seine Fachkompetenz, das jederzeitliche Engagement mit vielen Hilfestellungen und Anregungen, und schließlich die Korrektur des Manuskripts führten zum Ziel und der Fertigstellung dieser Arbeit.

Weiterhin gilt ein großer Dank Dr. Andrzej Dzionek für die Überlassung des Sca-1-Themas, seine fachliche Unterstützung und die kompetente Betreuung des Projektes.

In diesem Zusammenhang möchte ich mich vor allem bei Dr. Jens Fischer und Stefanie Kurig für die gesamte Vorarbeit im Sca-1-Projekt bedanken. Steffi, vielen Dank für die tolle inhaltliche und praktische Einarbeitung in das Projekt und Deine Hilfe bei allen Fragen. Ich danke Tobias Ozimkowski für die Bereitstellung der A95-KK.2H11.2C7-Reporterzelllinie.

Weitere Kollegen, bei denen ich mich für die Arbeit mit Mäusen und die nette Arbeitsatmosphäre im Labor bedanken möchte, sind Timo Adams und Anne Langhammer.

Allen meinen Bürokollegen (Sarah Hanselka, Ute Behrens-Jung, Eva Bergschneider, Constanze Lehmann, Lena Willnow, Yvonne Wiencek, Ute Heider, Dr. Ute Bissels, Dr. Stefan Wild, Michael Birth und Nina Koliha) danke ich für das angenehme Arbeitsklima, die freundliche Unterstützung und die große Hilfsbereitschaft, die ihr mir entgegen gebracht habt. Sarah, vielen lieben Dank für Dein offenes Ohr, die tröstenden und motivierenden Worte, die mich vor allem am Ende meiner Arbeit aufgebaut haben.

Auch der Abteilung des *Genomic Service* und der Bioinformatik, hier vor allem Dr. Stefan Tomiuk, aber auch Daniel Küsters danke ich für die gesamte Unterstützung rund um die Durchführung und Auswertung von Microarray-Analysen und der RT-PCR.

Weiterhin möchte ich mich bei Christoph Göttliger und Dr. Gunter Rappl für die FACS-Sortierungen bedanken. Ein großer Dank gilt der Arbeitsgruppe von Dr. Bernd Wollscheid und hier vor allem Dr. Andreas Frei für die sehr gute Zusammenarbeit.

Allen Teilnehmern des StudiClubs danke ich für die zahlreichen interessanten Diskussionen und wertvollen Anregungen. Besonders bedanken möchte ich mich bei Petra Bacher, Anne Schüler, Jennifer Brieden und Dr. Anna Casati für die freundschaftliche und hilfsbereite Unterstützung.

An dieser Stelle bedanke ich mich auch bei allen ehemaligen Kollegen. Einen großen Dank würde ich gerne an Dr. Björn Kolbe aussprechen, der mir am Anfang meiner Arbeit mit tatkräftiger Unterstützung zur Seite stand und mich sowohl inhaltlich als auch experimentell in die gesamte CD303-Ligand-Thematik eingearbeitet hat.

Meine letzten Worte würde ich gerne meinen Freunden und meiner Familie widmen.

Bei meinen Freunden möchte ich mich herzlich für die tiefe Freundschaft, die emotionale Unterstützung und die unendliche Motivation bedanken.

Ein besonderer Dank gilt meinem Freund Christian, der mich die letzten Jahre mit allen Höhen und Tiefen begleitet hat. Danke für Deine Geduld und Dein Verständnis in dieser schweren, aber mit Dir sehr schönen Zeit! Danke, dass Du immer für mich da bist und mir Mut und Kraft gegeben hast, diese Arbeit abzuschließen. Ich freue mich auf unsere gemeinsame Zukunft! In diesem Zusammenhang bedanke ich mich auch zutiefst bei meinen „Schwiegereltern“, die uns immer in unserem Vorhaben unterstützen, damit wir glücklich werden!

Zu guter Letzt möchte ich mich am meisten und aus tiefstem Herzen bei meinen Eltern und Schwestern Irina und Tatjana bedanken. Ihr habt mir diesen Weg ermöglicht und immer an mich geglaubt. Danke für Euer Vertrauen, Eure endlose Unterstützung und Eure bedingungslose Liebe!

Das Manuskript für eine Publikation (Niederquell *et al.*) befindet sich in der Vorbereitung und wird voraussichtlich Ende 2012 bei einer internationalen Fachzeitschrift eingereicht.

Einige der in dieser Arbeit vorgestellten Ergebnisse wurden in Zusammenarbeit mit verschiedenen Kooperationspartnern erzielt. Darauf wird bei der Vorstellung der Ergebnisse an entsprechender Stelle hingewiesen.

Lebenslauf

Der Lebenslauf ist in der Online-Version aus Gründen des Datenschutzes nicht enthalten.

Erklärung:

Hiermit erkläre ich, gem. § 6 Abs. 2, f der Promotionsordnung der Math.-Nat. Fakultäten zur Erlangung der Dr. rer. nat., dass ich das Arbeitsgebiet, dem das Thema „Plasmazytoide dendritische Zellen (PDC): Suche nach einem Liganden des humanen PDC-spezifischen Oberflächenrezeptors CD303 und funktionelle Charakterisierung von murinen Sca-1⁺ und Sca-1⁻ PDC-Subpopulationen“ zuzuordnen ist, in Forschung und Lehre vertrete und den Antrag von Marina Niederquell befürworte.

Essen, den _____
Name des wissenschaftl. Betreuers/Mitglieds der Universität Duisburg-Essen
Unterschrift des wissenschaftl. Betreuers/Mitglieds der Universität Duisburg-Essen

Erklärung:

Hiermit erkläre ich, gem. § 7 Abs. 2, c und e der Promotionsordnung der Math.-Nat. Fakultäten zur Erlangung des Dr. rer. nat., dass ich die vorliegende Dissertation selbständig verfasst und mich keiner anderen als der angegebenen Hilfsmittel bedient habe und alle wörtlich oder inhaltlich übernommenen Stellen als solche gekennzeichnet habe.

Essen, den _____
Unterschrift des/r Doktoranden/in

Erklärung:

Hiermit erkläre ich, gem. § 7 Abs. 2, d und f der Promotionsordnung der Math.-Nat. Fakultäten zur Erlangung des Dr. rer. nat., dass ich keine anderen Promotionen bzw. Promotionsversuche in der Vergangenheit durchgeführt habe, dass diese Arbeit von keiner anderen Fakultät abgelehnt worden ist, und dass ich die Dissertation nur in diesem Verfahren einreiche.

Essen, den _____
Unterschrift des/r Doktoranden/in